

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-513118

(P2019-513118A)

(43) 公表日 令和1年5月23日(2019.5.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16	Z N A 4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z 4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 7

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 101 頁) 最終頁に続く

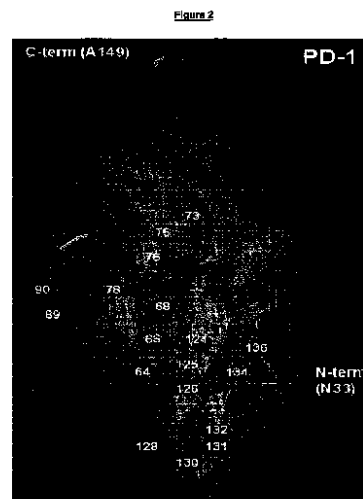
(21) 出願番号 特願2018-538647 (P2018-538647)
 (86) (22) 出願日 平成29年1月20日 (2017.1.20)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年9月25日 (2018.9.25)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2017/000031
 (87) 国際公開番号 WO2017/125815
 (87) 国際公開日 平成29年7月27日 (2017.7.27)
 (31) 優先権主張番号 62/286,269
 (32) 優先日 平成28年1月22日 (2016.1.22)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/290,745
 (32) 優先日 平成28年2月3日 (2016.2.3)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 517036884
 マブクエスト エスエー
 MabQuest SA
 スイス国 1009 ビュリー アヴェニ
 ュ ジェネラルーギザン 62 ケアオブ
 ジュゼッペ パンタレオ
 (74) 代理人 100073184
 弁理士 柳田 征史
 (74) 代理人 100123652
 弁理士 坂野 博行
 (74) 代理人 100175042
 弁理士 高橋 秀明
 (72) 発明者 パンタレオ, ジュゼッペ
 スイス国 CH-1009 ビュリー ア
 ヴェニユ ジェネラルーギザン 62
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫学的試薬

(57) 【要約】

本開示は、プログラム細胞死1 (PD-1) に対する特異性を有する結合剤、並びに、感染症 (例えば、ヒト免疫不全ウイルス (HIV))、がん及び/又は自己免疫を治療、予防及び/又は改善するためにそれを使用する方法に関する。さらに、本開示は、PD-L1又はPD-L2リガンドのいずれかと関連する相互作用部位とは区別されるPD-1のこれまで同定されていなかった機能活性に関連するPD-1上の新規な結合パッチ (「P2」) を同定する。さらには、PD-1のこの領域と相互作用する抗体が、PD-1のアンタゴニストとして作用できること、及びこの拮抗作用が、PD-1/PD-L1/L2相互作用の遮断を介して作用する抗体の添加と組み合わせるとさらに増強されることを実証する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記よりなる群から選択される1つ又は複数のアミノ酸配列、及び/又はその保存的又は非保存的置換誘導体を含む、プログラム細胞死1(PD1)に結合する結合剤：

QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGFTFTNYWIGWVRQA
PGQALEWMGDIYPGGGYTNYNEKFKGRVTITADKSTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARGYDFVLDRWGQGTTVTVSS (配列
番号139)；

10

QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGFTFTNYWIGWVRQA
PGQALEWMGDIYPGGGYTNYNEKFKGRVTITADKSTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARGYDFVLDRWGQGTTVTVSS (配列
番号140)；

QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGFTFTNYWIGWVRQA
PGQALEWMGDIYPGGGYTNYNEKFKGRVTITADKSTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARGYDFVLDRWGQGTTVTVSS (配列
番号141)；

20

QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGFTFTNYWIGWVRQA
PGQALEWMGDIYPGGGYTNYNEKFKGRVTITADKSTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARGYDFVLDRWGQGTTVTVSS (配列
番号142)；

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWIGWVRQA
PGQGLEWMGDIYPGGGYTNYNEKFKGRVTITADKSTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARGYDFVLDRWGQGTTVTVSS (配列
番号143)；

30

EVQLVQSGAEVKKHGESLKIISCKGSGYSFTNYWIGWVRQA
TGQGLEWMGDIYPGGGYTNYNEKFKGRVTITADKSTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARGYDFVLDRWGQGTTVTVSS (配列
番号144)；

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGYTFTNYWIGWVRQM
PGKGLEWMGDIYPGGGYTNYNEKFKGRVTITADKSTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARGYDFVLDRWGQGTTVTVSS (配列
番号145)；

40

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWIGWVRQA
PGKGLEWMGDIYPGGGYTNYNEKFKGRVTITADKSTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARGYDFVLDRWGQGTTVTVSS (配列
番号146)；

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWIGWVRQA
PGQGLEWMGDIYPGGGYTNYNEKFKGRVTMTTRDTSTSTVY
MELSSLRSEDTAVYYCARGYDFVLDRWGQGTLLVTVSS (配列
番号147)；

50

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAAGYTFFTNYWIGWVRQA
PGQGLEWMGDIYPGGGYTNYNEKFKGRVTMTADTSTSTVY
MELSSLRSEDTAVYYCARGYDFVLDLRWGQGTLLVTVSS (配列
番号148) ;

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFFTNYWIGWVRQA
PGQGLEWIGDIYPGGGYTNYNEKFKGRVTMTADTSTSTVY
MELSSLRSEDTAVYYCARGYDFVLDLRWGQGTLLVTVSS (配列
番号149) ;

10

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFFTNYWIGWIRQA
PGQGLEWIGDIYPGGGYTNYNEKFKGRATLTADTSTSTVY
MEVSSLRSEDTAVYYCARGYDFVLDLRWGQGTLLVTVSS (配列
番号150) ;

DVVMTQSPAFLSVTPGEEKVTITCKSSQS LFNSETQKNYLA
WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLT
ISSLQPEDFATYYCKQSYTLRTFGGGTKLEIK (配列番号151
) ;

20

DVVMTQSPAFLSVTPGEEKVTITCKSSQS LFNSETQKNYLA
WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLT
ISSLQPEDFATYYCKQSYTLRTFGGGTKLEIK (配列番号152
) ;

DVVMTQSPAFLSVTPGEEKVTITCKSSQS LFNSETQKNYLA
WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTFT
ISSLEAEDAATYYCKQSYTLRTFGGGTKLEIK (配列番号153
) ;

30

DVVMTQSPAFLSVTPGEEKVTITCKSSQS LFNSETQKNYLA
WYQQKPGQAPRLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTFT
ISSLEAEDAATYYCKQSYTLRTFGGGTKLEIK (配列番号154
) ;

DVVMTQSPAFLSVTPGEEKVTITCKSSQS LFNSETQKNYLA
WYQQKPGQAPRLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLT
ISSLQPEDFATYYCKQSYTLRTFGGGTKLEIK (配列番号155
) ;

40

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQS LFNSETQKNYLA
WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLT
ISSLQPEDFATYYCKQSYTLRTFGGGTKLEIK (配列番号156
) ;

DVVMTQSPAFLSVTPGEEKVTITCKSSQS LFNSETQKNYLA
WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLT
ISSLQPEDFATYYCKQSYTLRTFGGGTKLEIK (配列番号157
) ;

50

D V V M T Q S P A F L S V T P G E K V T I T C K S S Q S L F N S E T Q K N Y L A
 W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R E S G V P S R F S G S G S G T D F T F T
 I S S L E A E D A A T Y Y C K Q S Y T L R T F G G G T K L E I K (配列番号 1 5 8
) ;

D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C K S S Q S L F N S E T Q K N Y L A
 W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F S G S G S G T D F T L T
 I S S L Q A E D V A V Y Y C K Q S Y T L R T F G Q G T K L E I K (配列番号 1 5 9
) ;

10

D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I T C K S S Q S L F N S E T Q K N Y L A
 W Y Q Q K P G Q P P K L L I F W A S T R E S G V P D R F L G S G S G T D F T L T
 I S S L Q A E D V A V Y Y C K Q S Y T L R T F G Q G T K L E I K (配列番号 1 6 0
) ;

D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C K S S Q S L F N S E T Q K N Y L A
 W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F S G S G S G T D F T L T
 I S S L Q A E D V A V Y Y C K Q S Y T L R T F G Q G T K L E I K (配列番号 1 6 1
) ;

20

D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I T C K S S Q S L F N S E T Q K N Y L A
 W Y Q Q K P G Q P P K L L I F W A S T R E S G V P D R F S G S G S G T D F T L T
 I S S L Q A E D V A V Y Y C K Q S Y T L R T F G Q G T K L E I K (配列番号 1 6 2
) ;

D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T M T C K S S Q S L F N S E T Q K N Y L A
 W Y Q Q K P G Q P P K L L I F W A S T R E S G V P D R F S G S G S G T D F T L T
 I S S V Q A E D V A V Y Y C K Q S Y T L R T F G Q G T K L E I K (配列番号 1 6 3
) 。

30

【請求項 2】

- 配列番号 1 3 9 及び 1 5 1 ;
- 配列番号 1 4 0 及び 1 5 2 ;
- 配列番号 1 4 1 及び 1 5 3 ;
- 配列番号 1 4 2 及び 1 5 4 ;
- 配列番号 1 4 3 及び 1 5 5 ;
- 配列番号 1 4 4 及び 1 5 6 ;
- 配列番号 1 4 5 及び 1 5 7 ;
- 配列番号 1 4 6 及び 1 5 8 ;
- 配列番号 1 4 7 及び 1 5 9 ;
- 配列番号 1 4 8 及び 1 6 0 ;
- 配列番号 1 4 9 及び 1 6 1 ;
- 配列番号 1 5 0 及び 1 6 2 ; 及び
- 配列番号 1 4 3 及び 1 6 3

40

を含む、請求項 1 記載の結合剤。

【請求項 3】

下記に示す、配列番号 1 3 9 及び 1 5 1 を含むヒト化抗体 A 3 5 7 9 0、配列番号 1 4
 0 及び 1 5 2 を含むヒト化抗体 A 3 5 7 9 6、配列番号 1 4 1 及び 1 5 3 を含むヒト化抗
 体 A 3 5 7 9 3、配列番号 1 4 2 及び 1 5 4 を含むヒト化抗体 A 3 5 8 1 8、配列番号 1
 4 3 及び 1 5 5 を含むヒト化抗体 A 3 5 7 9 5、配列番号 1 4 4 及び 1 5 6 を含むヒト化

50

抗体 A 3 5 7 9 7、配列番号 1 4 5 及び 1 5 7 を含むヒト化抗体 A 3 5 7 9 9、又は配列番号 1 4 6 及び 1 5 8 を含むヒト化抗体 A 3 5 8 0 5 のいずれかとほぼ同一のヒト及びサルの PD - 1 に対する結合親和性 (k_a (M^{-1} / s^{-1})、 k_d (s^{-1})、及び KD (M)) ; 及び / 又は最低限 1 0 n M の親和性を示す、結合剤。

リガンド	ヒト PD-1 (配列番号 206)			サル PD-1 (配列番号 207)		
	k_a (M^{-1}/s^{-1})	k_d (s^{-1})	KD (M)	k_a (M^{-1}/s^{-1})	k_d (s^{-1})	KD (M)
マウス 137F2A11	1.37E+05	2.10E-04	1.54E-09	1.38E+05	3.05E-04	2.22E-09
A35790	9.13E+04	8.30E-05	9.09E-10	8.50E+04	1.38E-04	1.62E-09
A35796	1.04E+05	1.23E-04	1.18E-09	9.53E+04	9.81E-05	1.03E-09
A35793	1.04E+05	9.49E-05	9.12E-10	9.32E+04	1.05E-04	1.13E-09
A35818	9.88E+04	1.04E-04	1.06E-09	9.14E+04	1.16E-04	1.27E-09
A35795	1.03E+05	8.24E-05	7.97E-10	9.25E+04	1.52E-04	1.64E-09
A35797	1.00E+05	8.02E-05	8.02E-10	9.37E+04	1.06E-04	1.13E-09
A35799	1.01E+05	7.43E-05	7.34E-10	8.97E+04	1.69E-04	1.88E-09
A35805	9.37E+04	8.78E-05	9.37E-10	8.82E+04	9.49E-05	1.08E-09

【請求項 4】

下記よりなる群から選択される 1 つ又は複数のアミノ酸配列、及び / 又はその保守的又は非保守的置換誘導体を含む、プログラム細胞死 1 (PD1) に結合する結合剤 :

EVQLVQSGAEVKKKPGESLKISCKGSGYSFTNIFYIHWVRQAPGQRLIEWMGSIIYPNYGDTAYNQKFKDRFVFSLDTSVSTAYLQISSSLKAEDTAVYYCARGYSYAMDYWGQGTTVTVSS (配列番号 1 6 4) ;

EVQLVQSGAEVKKKPGESLKISCKGSGYSFTNIFYIHWVRQAPRGQRLIEWIGSIIYPNYGDTAYNQKFKDRFVFSLDTSVSTAYLQISSSLKAEDTAVYYCARGYSYAMDYWGQGTTVTVSS (配列番号 1 6 5) ;

EVQLVQSGAEVKKKPGESLKISCKGSGYSFTNIFYIHWVRQAPGQRLIEWMGSIIYPNYGDTAYNQKFKDRFVFSLDTSVSTAYLQISSSLKAEDTAVYYCARGYSYAMDYWGQGTTVTVSS (配列番号 1 6 6) ;

EVQLVQSGAEVKKKPGATVKISCKVSGYTFTNIFYIHWVRQAPRGQRLIEWIGSIIYPNYGDTAYNQKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSSLRSED TAVYYCARGYSYAMDYWGQGTTVTVSS (配列番号 1 6 7) ;

EVQLVQSGAEVKKKPGATVKISCKVSGYTFTNIFYIHWVRQAPGKGLEWMGSIIYPNYGDTAYNQKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSSLRSED TAVYYCARGYSYAMDYWGQGTTVTVSS (配列番号 1 6 8) ;

EVQLVQSGAEVKKKPGESLKISCKGSGYSFTNIFYIHWVRQM PGKGLEWMGSIIYPNYGDTAYNQKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSSLRSED TAVYYCARGYSYAMDYWGQGTTVTVSS (配列番号 1 6 9) ;

10

20

30

40

50

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNFYIHWVRQM
 PGKGLEWMGSIYPNYGDTAYNQKFKDRFVFSLDTSVSTAY
 LQISSSLKAEDTAVYYCARGYSYAMDYWGQGTTVTVSS (配列
 番号170) ;

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNFYIHWVRQM
 PGKGLEWMGSIYPNYGDTAYNQKFKDRFVFSLDTSVSTAY
 LQISSSLKAEDTAVYYCARGYSYAMDYWGQGTTVTVSS (配列
 番号171) ;

10

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNFYIHWVRQA
 PGQGLEWMGSIYPNYGDTAYNQKFKDRVTMTRDTSTSTVY
 MELSSLRSEDTAVYYCARGYSYAMDYWGQGTLLVTVSS (配列
 番号172) ;

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNFYIHWVRQA
 PGQGLEWMGSIYPNYGDTAYNQKFKDRVTMTVDKSTSTVY
 MELRSLRSEDTAVYYCARGYSYAMDYWGQGTLLVTVSS (配列
 番号173) ;

20

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNFYIHWVKQA
 HGQGLEWMGSIYPNYGDTAYNQKFKDRVTMTVDKSTSTVY
 MELRSLRSEDTAVYYCARGYSYAMDYWGQGTLLVTVSS (配列
 番号174) ;

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNFYIHWVRQA
 PGQGLEWIGSIYPNYGDTAYNQKFKDRVTMTVDTSTSTVY
 MELSSLRSEDTAVYYCARGYSYAMDYWGQGTLLVTVSS (配列
 番号175) ;

30

QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTNFYIHWVRQA
 PGQGLEWIGSIYPNYGDTAYNQKFKDRATLTVDTSTSTAY
 MELSSLRSEDTAVYYCARGYSYAMDYWGQGTLLVTVSS (配列
 番号176) ;

QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTNFYIHWVRQA
 PGQGLEWIGSIYPNYGDTAYNQKFKDRATLTVDKSTSTAY
 MELSSLRSEDTAVYYCARGYSYAMDYWGQGTLLVTVSS (配列
 番号177) .

40

DIQMTQSPSSVSA SVGDRVTITCSASQGISGDLNWKPKP
 GQAPRLLIYHTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQP
 EDFATYYCQYYSKDLLTFGGGTKLEIK (配列番号178) ;

DIQMTQSPSSLSASVSGDRVTITCSASQGISGDLNWKPKP
 GKTPKLLIYHTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQP
 EDFATYYCQYYSKDLLTFGGGTKLEIK (配列番号179) ;

DIQMTQSPSSVSA SVGDRVTITCSASQGISGDLNWKPKP

50

G K A P K L L I Y H T S S L H S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
E D F A T Y Y C Q Y Y S K D L L T F G G G T K L E I K (配列番号 180) ;

D I Q M T Q S P S S V S A S V G D R V T I T C S A S Q G I S G D L N W Y Q Q K P
G Q A P R L L I Y H T S S L H S G V P S R F S G S G S G T E F T L T I S R L E P
E D F A V Y Y C Q Y Y S K D L L T F G G G T K L E I K (配列番号 181) ;

D I Q M T Q S P S T L S A S V G D R V T I T C S A S Q G I S G D L N W Y Q Q K P
G Q A P R L L I Y H T S S L H S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
E D F A T Y Y C Q Y Y S K D L L T F G G G T K L E I K (配列番号 182) ;

10

D I Q M T Q S P S S V S A S V G D R V T I T C S A S Q G I S G D L N W Y Q Q K P
G Q A P R L L I Y H T S S L H S G I P A R F S G S G S G T D F T L T I S R L E P
E D F A V Y Y C Q Y Y S K D L L T F G G G T K L E I K (配列番号 183) ;

D I Q M T Q S P S T L S A S V G D R V T I T C S A S Q G I S G D L N W Y Q Q K P
G K T P K L L I Y H T S S L H S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
E D F A T Y Y C Q Y Y S K D L L T F G G G T K L E I K (配列番号 184) ;

D I Q M T Q S P S T L S A S V G D R V T I T C S A S Q G I S G D L N W Y Q Q K P
G Q A P R L L I Y H T S S L H S G I P A R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
E D F A V Y Y C Q Y Y S K D L L T F G G G T K L E I K (配列番号 185) ;

20

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C S A S Q G I S G D L N W Y Q Q K P
G K A P K L L I Y H T S S L H S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
E D F A T Y Y C Q Y Y S K D L L T F G G G T K L E I K (配列番号 186) ;

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C S A S Q G I S G D L N W Y Q Q K P
G K A V K L L I Y H T S S L H S G V P L R F S G S G S G T D Y T L T I S S L Q P
E D F A T Y Y C Q Y Y S K D L L T F G G G T K L E I K (配列番号 187) ;

30

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C S A S Q G I S G D L N W Y Q Q K S
D G A V K L L I Y H T S S L H S G V P L R F S G S G S G T D Y T L T I S S L Q P
E D F A T Y Y C Q Y Y S K D L L T F G G G T K L E I K (配列番号 188) ;

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C S A S Q G I S G D L N W Y Q Q K P
G K A P K L L I Y H T S S L H S G V P S R F S G S G S G T D Y T L T I S S L Q P
E D F A T Y Y C Q Y Y S K D L L T F G G G T K L E I K (配列番号 189) ;

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C S A S Q G I S G D L N W Y Q Q K P
G K A V K L L I Y H T S S L H S G V P S R F S G S G S G T D Y T L T I S S L Q P
E D F A T Y Y C Q Y Y S K D L L T F G G G T K L E L K (配列番号 190) .

40

【請求項 5】

- 配列番号 164 及び 178 ;
- 配列番号 165 及び 179 ;
- 配列番号 166 及び 180 ;
- 配列番号 167 及び 181 ;
- 配列番号 168 及び 182 ;
- 配列番号 169 及び 183 ;
- 配列番号 170 及び 184 ;

50

配列番号 171 及び 185 ;
 配列番号 172 及び 186 ;
 配列番号 173 及び 187 ;
 配列番号 174 及び 188 ;
 配列番号 175 及び 189 ;
 配列番号 176 及び 190 ; 及び
 配列番号 177 及び 190

を含む、請求項 4 記載の結合剤。

【請求項 6】

下記に示す、配列番号 164 及び 178 を含むヒト化抗体 A35775、配列番号 165 及び 179 を含む A35783、配列番号 166 及び 180 を含む A35774、配列番号 167 及び 181 を含む A36443、配列番号 168 及び 182 を含む A35777、配列番号 169 及び 183 を含む A35789、配列番号 170 及び 184 を含む A36448、又は配列番号 171 及び 185 を含む A36437 のいずれかとほぼ同一のヒト及びサル PD-1 に対する結合親和性 (k_a (M^{-1}/s^{-1})、 k_d (s^{-1})、及び KD (M)) ; 及び / 又は最低限 10 nM の親和性を示す、結合剤。

リガンド	ヒト PD-1			サル PD-1		
	k_a (M^{-1}/s^{-1})	k_d (s^{-1})	KD (M)	k_a (M^{-1}/s^{-1})	k_d (s^{-1})	KD (M)
A35775	8.02E+04	2.03E-04	2.54E-09	6.05E+04	3.47E-04	5.73E-09
A35783	7.68E+04	1.96E-04	2.55E-09	4.21E+05	8.00E-04	1.90E-09
A35774	8.09E+04	2.11E-04	2.61E-09	6.93E+04	1.94E-04	2.79E-09
A36443	7.12E+04	2.15E-04	3.02E-09	9.49E+04	5.85E-04	6.16E-09
A35789	7.01E+04	2.93E-04	4.17E-09	6.67E+04	4.13E-04	6.19E-09
A36437	7.10E+04	3.17E-04	4.46E-09	6.07E+04	3.68E-04	6.07E-09
A35777	6.86E+04	3.52E-04	5.13E-09	1.15E+05	5.75E-04	5.00E-09
A36448	8.96E+04	3.86E-04	4.31E-09			

【請求項 7】

PD-1 (配列番号 275) に対する特異性を有する結合剤であって、前記結合剤の特異性が、配列番号 247 (M4) におけるような、セリン 38、プロリン 39、及び / 又はロイシン 41 に対応するアミノ酸 ; 及び / 又は配列番号 260 (M17) におけるような、アスパラギン 102 及び / 又はアルギニン 104 に対応するアミノ酸 ; 及び / 又は配列番号 261 (M18) におけるような、アスパラギン酸塩 105 に対するアミノ酸置換 ; 及び / 又は配列番号 274 (M31) におけるような、ロイシン 41 及び / 又はバリン 43 に対するアミノ酸置換に依存する、結合剤。

【請求項 8】

配列番号 275 のセリン 38、プロリン 39、ロイシン 41 及び / 又はバリン 43 に対応するアミノ酸の置換 (M4) が、その配列への前記結合剤の結合性を低減させる、請求項 7 記載の結合剤。

【請求項 9】

配列番号 275 において、ロイシン 41 に対応するアミノ酸がアラニンで置換され及び / 又はバリン 43 に対応するアミノ酸がロイシンで置換される (M4)、請求項 7 記載の結合剤。

【請求項 10】

配列番号 275 のアスパラギン 102 及び / 又はアルギニン 104 に対応するアミノ酸の置換 (M17) が、その配列への前記結合剤の結合性を低減させる、請求項 7 記載の結合剤。

【請求項 11】

配列番号 275 におけるアスパラギン 102 に対応するアミノ酸がアラニンで置換され、及び配列番号 275 におけるアルギニン 104 に対応するアミノ酸がロイシンに置換される (M17)、請求項 7 記載の結合剤。

【請求項 12】

10

20

30

40

50

PD - 1 (配列番号 275) に結合する能力を有するが PD - 1 M4 (配列番号 247) には結合しない結合剤。

【請求項 13】

PD - 1 (配列番号 275) に結合する能力を有するが PD - 1 M17 (配列番号 260) には結合しない結合剤。

【請求項 14】

PD - 1 (配列番号 275) のアミノ酸 F37、P39、A40、L41、V43、L138、R139、及び R143；及び/又は PD - 1 (配列番号 275) のアミノ酸 P34、S137 及び R139 に結合する能力を有する結合剤。

【請求項 15】

細胞上の PD - 1 に対するアンタゴニスト活性を有する、請求項 7 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の結合剤。

【請求項 16】

前記アンタゴニスト活性が、機能的疲弊回復アッセイにより特定される、請求項 15 に記載の結合剤。

【請求項 17】

単離モノクローナル抗体である、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の結合剤。

【請求項 18】

請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の結合剤の誘導体。

【請求項 19】

F_{ab}、F_{ab2}、F_{ab'} 一本鎖抗体、F_v、一本鎖、単一特異性抗体、二重特異性抗体、三量体抗体、多重特異性抗体、多価抗体、キメラ抗体、イヌ - ヒトキメラ抗体、イヌ - マウスキメラ抗体、イヌFc を含む抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、イヌ化抗体、CDR グラフト化抗体、サメ抗体、ナノボディ及びラクダ抗体からなる群より選択される、請求項 18 に記載の誘導体。

【請求項 20】

PD - 1 に対する第 1 の特異性、及び異なる抗原に対する第 2 の特異性を少なくとも有する、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の結合剤又は誘導体、或いは請求項 47 ~ 51 のいずれか 1 項に記載の組合せ。

【請求項 21】

前記第 2 の特異性は、感染性因子の抗原又は腫瘍抗原に対するものである、請求項 20 に記載の結合剤又は誘導体。

【請求項 22】

前記感染性因子はヒト免疫不全ウイルス (HIV) である、請求項 21 に記載の結合剤又は誘導体。

【請求項 23】

前記抗原は HIV env である、請求項 22 に記載の結合剤又は誘導体。

【請求項 24】

固定的に付着した検出可能な標識を含む、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の結合剤又はその誘導体。

【請求項 25】

前記検出可能な標識は、フルオロセイン、Dylight、Cy3、Cy5、FITC、HiLyte Fluor 555、HiLyte Fluor 647、5 - カルボキシ - 2', 7' - ジクロロフルオレセイン、5 - カルボキシフルオレセイン、5 - FAM、ヒドロキシトリプタミン、5 - ヒドロキシトリプタミン (5 - HAT)、6 - カルボキシフルオレセイン (6 - FAM)、FITC、6 - カルボキシ - 1', 4' - ジクロロ - 2', 7' - ジクロロフルオレセイン (TET)、6 - カルボキシ - 1', 4' - ジクロロ - 2', 4', 5', 7' - テトラクロロフルオレセイン (HEX)、6 - カルボキシ - 4', 5' - ジクロロ - 2', 7' - ジメトキシフルオレセイン (6 - JOE)、Alexa fluor、Alexa fluor 350、Alexa fluor 405、Ale

10

20

30

40

50

x a f l u o r 4 3 0、A l e x a f l u o r 4 8 8、A l e x a f l u o r 5 0 0、A l e x a f l u o r 5 1 4、A l e x a f l u o r 5 3 2、A l e x a f l u o r 5 4 6、A l e x a f l u o r 5 5 5、A l e x a f l u o r 5 6 8、A l e x a f l u o r 5 9 4、A l e x a f l u o r 6 1 0、A l e x a f l u o r 6 3 3、A l e x a f l u o r 6 3 5、A l e x a f l u o r 6 4 7、A l e x a f l u o r 6 6 0、A l e x a f l u o r 6 8 0、A l e x a f l u o r 7 0 0、A l e x a f l u o r 7 5 0、B O D I P Y 蛍光体、B O D I P Y 4 9 2 / 5 1 5、B O D I P Y 4 9 3 / 5 0 3、B O D I P Y 5 0 0 / 5 1 0、B O D I P Y 5 0 5 / 5 1 5、B O D I P Y 5 3 0 / 5 5 0、B O D I P Y 5 4 2 / 5 6 3、B O D I P Y 5 5 8 / 5 6 8、B O D I P Y 5 6 4 / 5 7 0、B O D I P Y 5 7 6 / 5 8 9、B O D I P Y 5 8 1 / 5 9 1、B O D I P Y 6 3 0 / 6 5 0 - X、B O D I P Y 6 5 0 / 6 6 5 - X、B O D I P Y 6 6 5 / 6 7 6、F L、F L A T P、F I - セラミド、R 6 G S E、T M R、T M R - X コンジュゲート、T M R - X、S E、T R、T R A T P、T R - X S E、ローダミン、ローダミン 1 1 0、ローダミン 1 2 3、ローダミン B、ローダミン B 2 0 0、ローダミン B B、ローダミン B G、ローダミン B e x t r a、5 - カルボキシテトラメチルローダミン (5 - T A M R A)、5 G L D、6 - カルボキシローダミン 6 G、リサミン、リサミンローダミン B、ファリシジン、ファロイジン、ローダミンレッド、R h o d - 2、6 - カルボキシ - X - ローダミン (R O X)、カルボキシ - X - ローダミン (5 - R O X)、スルホローダミン B c a n C、スルホローダミン G E x t r a、6 - カルボキシテトラメチルローダミン (T A M R A)、テトラメチルローダミン (T R I T C)、ローダミン W T、テキサスレッド及びテキサスレッド - X からなる群より選択される、請求項 2 4 に記載の結合剤。

【請求項 2 6】

固定的に付着したエフェクター部分を含む、請求項 1 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載の結合剤又は誘導体。

【請求項 2 7】

前記エフェクター部分は、細胞毒性薬、毒素、ジフテリア A 鎖、外毒素 A 鎖、リシン A 鎖、アプリン A 鎖、クルシン、クロチン、フェノマイシン、エノマイシン及び放射化学物質からなる群より選択される、請求項 2 6 に記載の結合剤又は誘導体。

【請求項 2 8】

請求項 1 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の結合剤をコードする単離ポリヌクレオチド。

【請求項 2 9】

配列番号 1 9 1 ~ 2 4 3 のいずれかを含む、請求項 2 8 に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項 3 0】

請求項 2 8 又は 2 9 に記載の 1 つ又は複数のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 3 1】

請求項 2 8 又は 2 9 に記載の単離ポリヌクレオチド及び / 又は請求項 3 0 に記載の発現ベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 3 2】

請求項 1 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載の結合剤又は誘導体の少なくとも 1 つ；請求項 2 8 又は 2 9 に記載の単離ポリヌクレオチドの少なくとも 1 つ；請求項 3 0 に記載の発現ベクターの少なくとも 1 つ；及び / 又は請求項 3 1 に記載の宿主細胞の少なくとも 1 つ；又はそれらの組合せ；及び / 又は請求項 4 9 ~ 5 1 のいずれか 1 項に記載の組合せ；並びに医薬上許容される担体を含む、組成物。

【請求項 3 3】

細胞上の P D - 1 を検出する方法であって、

試験生物学的サンプルを、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の結合剤又は誘導体及び / 又は請求項 4 9 ~ 5 1 のいずれか 1 項に記載の組合せと接触させる工程、及び

前記生物学的サンプル又はその成分に結合した結合剤を検出する工程、
を有してなる方法。

【請求項 34】

前記試験生物学的サンプル又はその成分に結合した量を、対照生物学的サンプル又はその成分に結合した量と比較する工程をさらに含み、前記対照生物学的サンプル又はその成分に結合した量と比較した、試験生物学的サンプル又はその成分に結合した量の増加は、試験生物学的サンプルにおける PD-1 を発現する細胞の存在を示す、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

前記試験生物学的サンプルは哺乳動物の血液である、請求項 33 又は 34 に記載の方法

10

【請求項 36】

前記方法は *in vivo* 法である、請求項 33 ~ 35 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 37】

前記方法は *in vitro* 法である、請求項 33 ~ 35 のいずれか 1 項に記載の方法

【請求項 38】

哺乳動物において、感染性疾患、がん及び / 又は自己免疫状態を治療、予防及び / 又は改善する方法であって、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の結合剤又は誘導体、及び / 又は請求項 49 ~ 51 のいずれか 1 項に記載の組合せを含む医薬組成物の少なくとも 1

20

【請求項 39】

前記感染性疾患はヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染である、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

前記結合剤が細胞毒性活性薬剤にコンジュゲートされており、前記結合剤又はその誘導体の投与後、前記哺乳動物における HIV - 感染 CD4⁺ T 細胞の数が減少する、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

感染性疾患、HIV 感染及び / 又はがんを治療するために使用される前記結合剤及び / 又は誘導体は、PD-1 アンタゴニストである、請求項 38 ~ 40 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 42】

自己免疫状態を治療するために使用される前記結合剤及び / 又は誘導体は、PD-1 アンタゴニストである、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 43】

ヒト対象において、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染を治療する方法であって、少なくとも 2 つのアンタゴニスト PD-1 結合剤の組合せを投与することを含み、

前記結合剤のそれぞれが、PD-1 上の異なるエピトープに対する特異性を有し、

前記結合剤の少なくとも 1 つは PD-1 と PD-L1 との相互作用にブロッキング性で

40

あり、
前記結合剤の少なくとも 1 つは PD-1 と PD-L1 との相互作用に非ブロッキング性である、方法。

【請求項 44】

前記組合せが、他方の結合剤の非存在下でのいずれかの一方の結合剤を超えて、HIV 特異的 CD8⁺ T 細胞の機能的疲弊の救済を増強し及びその増殖を高める、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 45】

前記結合剤の少なくとも 1 つは、請求項 7 ~ 14 のいずれか 1 つ又は複数の結合剤である、請求項 43 又は 44 に記載の方法。

50

- 【請求項 46】
前記哺乳動物に複数回投与される、請求項 38～45 のいずれか 1 項に記載の方法。
- 【請求項 47】
前記結合剤は、約 1～50 mg/kg の用量で投与される、請求項 38～46 のいずれか 1 項に記載の方法。
- 【請求項 48】
細胞内又は細胞上での PD-1 の発現を検出するためのキットであって、請求項 1～19 のいずれか 1 項に記載の結合剤又は誘導体、或いは請求項 50～54 のいずれか 1 項に記載の組合せ、及び使用説明書を含む、キット。
- 【請求項 49】 10
前記結合剤、抗体又は誘導体は、凍結乾燥形態にある、請求項 48 に記載のキット。
- 【請求項 50】
PD-1 と PD-L1 との相互作用をブロックする第 1 結合剤、及び PD-1 と PD-L1 との相互作用をブロックしない第 2 結合剤を含む、結合剤の組合せ。
- 【請求項 51】
前記第 2 結合剤は PD-1 に結合する、請求項 50 に記載の組合せ。
- 【請求項 52】
前記第 1 及び / 又は第 2 結合剤は抗体である、請求項 50 又は 51 に記載の組合せ。
- 【請求項 53】 20
前記結合剤はモノクローナル抗体である、請求項 50～52 のいずれか 1 項に記載の組合せ。
- 【請求項 54】
前記第 2 結合剤は、配列番号 17、40、63、86、109、及び 132 (135C12) ; 配列番号 2、25、48、71、94、及び 117 (139D6) ; 配列番号 3、26、49、72、95、及び 118 (135D1) ; 又は配列番号 19、42、65、88、111、及び 134 (136B4) のアミノ酸配列を含む、請求項 50～53 のいずれか 1 項に記載の組合せ。
- 【請求項 55】 30
前記第 1 結合剤と前記第 2 結合剤とを組み合わせることを含む、請求項 50～54 のいずれか 1 項に記載の組合せを作製する方法。
- 【請求項 56】
医薬上許容される賦形剤の添加をさらに含む、請求項 55 に記載の方法。
- 【請求項 57】
請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載の結合剤を製造する方法であって、
細胞において前記結合剤を発現させる工程 ; 及び
前記細胞又は前記細胞の培養上清から前記結合剤を単離する工程 ;
を有してなる方法。
- 【請求項 58】 40
前記結合剤をコードする核酸を宿主細胞において発現させる工程をさらに含む、請求項 57 に記載の方法。
- 【請求項 59】
単離後、前記結合剤を医薬上許容される賦形剤と組み合わせる工程をさらに含む、請求項 57 又は 58 に記載の方法。
- 【請求項 60】
PD-1 の機能に影響を及ぼす方法であって、活性薬剤を、PD-1 の P2 パッチ内の 1 つ又は複数のアミノ酸残基と相互作用させることを含む、方法。
- 【請求項 61】 50
前記 1 つ又は複数のアミノ酸残基が、配列番号 275 のトレオニン 36、フェニルアラニン 37、セリン 38、プロリン 39、ロイシン 41、パリン 43、アラニン 50、トレオニン 51、フェニルアラニン 52、トレオニン 53、システイン 54、セリン 55、ア

スパラギン酸 85、アルギニン 86、アスパラギン 102、アルギニン 104、アスパラギン酸 105、フェニルアラニン 106、ヒスチジン 107、及びメチオニン 108 に対応する、請求項 60 に記載の方法。

【請求項 62】

PD-1 の機能に影響を及ぼす方法であって、活性薬剤を、細胞内又は細胞上の PD-1 の領域と相互作用させることを含み、前記領域が、

配列番号 275 のセリン 38、プロリン 39、ロイシン 41 及び / 又はバリン 43 に対応する 1 つ又は複数のアミノ酸残基 (M4) ; 及び / 又は、

配列番号 275 のロイシン 41 及び / 又はバリン 43 に対応する 1 つ又は複数のアミノ酸残基 (M31) ; 及び / 又は

配列番号 275 のアスパラギン酸 85 及び / 又はアルギニン 86 に対応する 1 つ又は複数のアミノ酸残基 (M13) ; 及び / 又は

配列番号 275 のアスパラギン 102 及び / 又はアルギニン 104 に対応する 1 つ又は複数のアミノ酸残基 (M17) ; 及び / 又は

配列番号 275 のアスパラギン酸塩 105 に対応する 1 つ又は複数のアミノ酸残基 (M18)

を含む、方法。

【請求項 63】

PD-1 の機能に拮抗的に影響を及ぼすことを含み、請求項 62 に記載の方法。

【請求項 64】

前記活性薬剤が、1 つ又は複数の PD-1 結合剤を含む、請求項 62 又は 63 に記載の方法。

【請求項 65】

前記 PD-1 結合剤の 1 つ又は複数が、

配列番号 275 のセリン 38、プロリン 39、ロイシン 41 及び / 又はバリン 43 に対応する 1 つ又は複数のアミノ酸残基 (M4) ; 及び / 又は

配列番号 275 のアスパラギン酸 85 及び / 又はアルギニン 86 に対応する 1 つ又は複数のアミノ酸残基 (M13) ; 及び / 又は

配列番号 275 のアスパラギン 102 及び / 又はアルギニン 104 に対応する 1 つ又は複数のアミノ酸残基 (M17) ; 及び / 又は

配列番号 275 のアスパラギン酸塩 105 に対応する 1 つ又は複数のアミノ酸残基 (M18)

を含む領域に結合特異性を有する、請求項 64 に記載の方法。

【請求項 66】

配列番号 275 におけるセリン 38、プロリン 39、ロイシン 41 及び / 又はバリン 43 に対応するアミノ酸の置換 (M4) が、前記活性薬剤の PD-1 との相互作用を低減及び / 又は排除する、請求項 62 ~ 65 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 67】

前記置換の 1 つ、2 つ、3 つ又は 4 つがアラニンによる置換である、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 68】

配列番号 275 におけるアスパラギン酸 85 及び / 又はアルギニン 86 に対応するアミノ酸の置換 (M13) が、前記活性薬剤の PD-1 との相互作用を低減及び / 又は排除する、請求項 62 ~ 66 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 69】

前記置換の 1 つ又は両方がアラニンによる置換である、請求項 68 に記載の方法。

【請求項 70】

配列番号 275 におけるアスパラギン 102 に対応するアミノ酸の置換及び / 又は配列番号 275 におけるアルギニン 104 に対応するアミノ酸の置換 (M17) が、前記活性薬剤の PD-1 との相互作用を低減及び / 排除する、請求項 62 ~ 65 のいずれか 1 項に

10

20

30

40

50

記載の方法。

【請求項 7 1】

アスパラギン 1 0 2 の置換がアラニンによる置換であり及び / 又はアルギニン 1 0 4 の置換がアラニンによる置換である、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 2】

配列番号 2 7 5 におけるアスパラギン酸塩 1 0 5 に対応するアミノ酸の置換 (M 1 8) が、前記活性薬剤の P D - 1 との相互作用を低減及び / 排除する、請求項 6 2 ~ 6 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記置換がアラニンによる置換である、請求項 7 2 に記載の方法。

10

【請求項 7 4】

前記結合剤が、P D - 1 (配列番号 2 7 5) に結合する能力を有するが、P D - 1 M 4 (配列番号 2 4 7)、M 1 3 (配列番号 2 5 6)、M 1 7 (配列番号 2 6 0)、及び / 又は M 1 8 (配列番号 2 6 1) には結合しない、請求項 6 2 ~ 7 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 5】

P D - 1 と P D - L 1 及び / 又は P D - L 2 との相互作用に関連する部位で、P D - 1 と相互作用させることをさらに含む、請求項 6 2 ~ 7 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記活性薬剤が抗体である、請求項 6 2 ~ 7 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 7 7】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記抗体がヒト化抗体である、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 7 9】

配列番号 2 4 4 ~ 2 7 4 からなる群より選択される改変 P D 1 ポリペプチド。

【請求項 8 0】

結合剤が結合する P D - 1 上のエピトープを特定する方法であって、前記結合剤を請求項 7 6 に記載の改変 P D 1 ポリペプチドと接触させることを含む、方法。

【請求項 8 1】

前記結合剤が抗体である、請求項 8 0 に記載の方法。

30

【請求項 8 2】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 3】

前記抗体がヒト化抗体である、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 4】

請求項 7 9 に記載の改変 P D 1 ポリペプチドを含む、結合剤が結合する P D - 1 上のエピトープを特定するためのキット。

【請求項 8 5】

対象において炎症を治療する方法であって、少なくとも 2 つのアンタゴニスト P D - 1 結合剤の組合せを投与することを含み、前記結合剤のそれぞれが、P D - 1 上の異なるエピトープに対する特異性を有し、前記結合剤の少なくとも 1 つは P D - 1 と P D - L 1 との相互作用にブロッキング性であり、かつ前記結合剤の少なくとも 1 つは P D - 1 と P D - L 1 との相互作用に非ブロッキング性である、方法。

40

【請求項 8 6】

対象において慢性神経変性状態を治療する方法であって、少なくとも 2 つのアンタゴニスト P D - 1 結合剤の組合せを投与することを含み、前記結合剤のそれぞれが、P D - 1 上の異なるエピトープに対する特異性を有し、前記結合剤の少なくとも 1 つは P D - 1 と P D - L 1 との相互作用にブロッキング性であり、かつ前記結合剤の少なくとも 1 つは P D - 1 と P D - L 1 との相互作用に非ブロッキング性である、方法。

50

【請求項 87】

慢性神経変性状態がアルツハイマー病である、請求項 86 に記載の方法。

【請求項 88】

In vivo で腫瘍細胞の増殖を阻害する方法であって、少なくとも 2 つのアンタゴニスト PD-1 結合剤の組合せを投与することを含み、前記結合剤のそれぞれが、PD-1 上の異なるエピトープに対する特異性を有し、前記結合剤の少なくとも第 1 結合剤が PD-1 と PD-L1 との相互作用にブロッキング性であり、かつ前記結合剤の少なくとも第 2 結合剤が PD-1 と PD-L1 との相互作用に非ブロッキング性である、方法。

【請求項 89】

前記腫瘍細胞がヒト腫瘍細胞である、請求項 88 に記載の方法。

10

【請求項 90】

がんを治療する方法である、請求項 88 に記載の方法。

【請求項 91】

前記第 2 結合剤が、配列番号 17、40、63、86、109 及び 132 の内の少なくとも 1 つを含む、請求項 88 ~ 90 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 92】

前記第 2 結合剤が、配列番号 164 ~ 190 の内の少なくとも 1 つ、又は少なくとも 1 つのアミノ酸置換を有するその誘導体を含む、請求項 88 ~ 91 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 93】

前記第 2 結合剤が、配列番号 176 及び 190 の内の少なくとも 1 つ、又は少なくとも 1 つのアミノ酸置換を有するその誘導体を含む、請求項 92 に記載の方法。

20

【請求項 94】

前記第 2 結合剤が、配列番号 176 及び 190 を含む、請求項 93 に記載の方法。

【請求項 95】

前記結合剤がヒト化抗体である、請求項 85 ~ 94 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 96】

前記第 1 結合剤が MK3475 である、請求項 85 ~ 95 のいずれか 1 項に記載の方法

【請求項 97】

前記第 1 結合剤が、R A S K G V S T S G Y S Y L H (配列番号 287)、L A S Y L E S (配列番号 288)、Q H S R D L P L T (配列番号 289)、N Y Y M Y (配列番号 290)、G I N P S N G G T N F N E K F K N (配列番号 291)、及び / 又は R D Y R F D M G F D Y (配列番号 292) を含む、請求項 85 ~ 96 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 98】

前記結合剤の少なくとも 1 つが、請求項 7 ~ 14 のいずれか 1 つ又は複数の結合剤である、請求項 85 ~ 97 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 99】

哺乳動物に多数回投与される、請求項 85 ~ 98 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 100】

少なくとも約 1 ヶ月隔てて少なくとも 2 回投与される、請求項 99 に記載の方法。

【請求項 101】

前記結合剤が、約 0.1 ~ 50 mg / kg の用量で投与される、請求項 85 ~ 100 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0001】

本出願は、その両方がここに参照することによって全体として本開示に組み込まれる、2016年1月22日出願の米国特許出願第 62 / 286, 269 号、及び 2016年2

50

月3日出願の米国特許出願第62/290,745号の優先権の利益を主張する。

【技術分野】

【0002】

本開示は、プログラム細胞死1(PD-1)(例えば、ヒトPD-1)に対する特異性を有する結合剤、並びに感染症(例えば、ヒト免疫不全ウイルス(HIV))、がん及び/又は自己免疫を治療及び/又は予防するためにそれを使用する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

HIVが流行し始めてから40年目に入り、HIVの病因に関する理解が進み、強力で安全な抗ウイルス薬の開発が大きな進歩を遂げてきた。30種を超える抗ウイルス薬が登録され、組合せ抗レトロウイルス療法(ART)が罹患率及び死亡率に及ぼす影響は顕著なものとなっている。しかしながら、ARTを最適に順守した患者においてHIV複製の長期間にわたる抑制が達成されてきたにもかかわらず、治療の中断後にはHIVは常に逆戻りする。さらに、成功した療法は、ARTの非存在下でHIV複製を制御できるウイルス特異的免疫応答を誘導せず、或いはその回復/発生を可能にしない。従って、大半のHIV感染対象においてHIV複製及び関連疾患を制御するために生涯にわたりARTが必要とされる。

10

【0004】

HIVに潜伏感染した長寿命のセントラルメモリーCD4 T細胞集団が、HIV細胞リザーバーの重要な構成要素として、及びHIVの永続性の主要原因として、血液中において同定されている。この潜伏細胞リザーバーの寿命は、ARTを用いた完全HIV抑制の存在下ではおよそ70年であると推定されている。しかし、近年の試験は、リンパ節内に常在するCD4 T細胞の2つの集団が、HIVの感染、複製及び生成のための主要なCD4 T細胞コンパートメントとして機能することを証明している。これらの2つのCD4 T細胞集団は、PD-1及びCXCR5の発現によって規定され、PD-1⁺CXCR5⁺、すなわち濾胞性ヘルパーT細胞(Tfh)、及びPD-1⁺CXCR5⁻CD4 T細胞集団を含む。

20

【0005】

HIV潜伏細胞リザーバーの確立及び維持を担う多数のメカニズムが提案されている。そのメカニズムの1つは、HIV細胞リザーバーを補充し得る、ART下での最小ウイルス複製の持続である。従って、ARTは、HIV複製の完全抑制を誘導することができず、ART下での「天然」HIV-1特異的免疫応答も、進行中の残留ウイルス複製を完全に抑制及び排除することができない。ART及びHIV特異的免疫応答の失敗は、永続的なHIV細胞リザーバーをも標的とする代替介入を検討する理論的根拠を提供する。

30

【0006】

これまでに多数の免疫学的介入が検討されてきたが、現在でも、持続的な抗ウイルス療法なしにウイルス複製が抑制されるHIVの機能的治癒を達成することを目標として、さらに開発が続けられている(9)。治療的ワクチン戦略は検討された主要な介入戦略であったが、その結果は、実験動物モデル及び患者において、CMVをベースとするベクターHIVワクチン(NHPモデルにおいて50%の有効性;10)を除いて、わずかな有効性しか示していない。近年の試験は、HIV感染症における治療薬として抗エンペロープ広域中和抗体(bNabs)を使用する可能性に関して興味深い結果をもたらした(11、12)。さらに、アンタゴニストPD-1抗体(Ab)は、HIV感染患者においてT細胞機能を回復させることが示されており、HIV特異的T細胞応答の効力を増強する治療戦略として、これらの抗体を使用する可能性が提案されている(13、14)。

40

【0007】

浸潤性腫瘍特異的CD8 T細胞が、増殖し及び細胞傷害活性を媒介する能力に関して機能不全であることはよく確証されている。大半の浸潤性腫瘍特異的CD8 T細胞は、いわゆる機能的疲弊状態にある。浸潤性腫瘍特異的CD8 T細胞の疲弊を担う主要なメカニズムは、多数の調節受容体及び特にPD-1調節受容体の発現の増加である。PD-

50

1 / P D L - 1 / 2 (P D - 1 リガンド) の遮断 (ブロック) が C D 8 T 細胞の疲弊からの回復に関連していることの見解は、疲弊 C D 8 T 細胞により発現された P D - 1 分子を標的とする介入戦略を開発するための理論的根拠を提供している。近年の試験は、進行性がん関連疾患を有する患者における、アンタゴニスト活性を有する P D - 1 抗体の使用による極めて前途有望な結果を示している。試験は、進行性黒色腫、非小細胞性肺癌及び腎がんの患者において、18 ~ 40 % の範囲の実質的な応答率を示している。これらの試験において、抗 P D - 1 抗体は、単独で又は抗 C T L - A 4 抗体と組み合わせて使用された。これらの初期の試験の後、血液腫瘍も含む様々な腫瘍の患者において、現在の試験が行なわれている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本技術分野において、P D - 1 を標的とするための追加の試薬及びそれを使用する方法に対する要求がある。本開示は、P D - 1 及びそれを発現する細胞及び / 又は組織を標的とするのに使用できる試薬及び方法を提供することによって、それらの要求に対処する。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本開示は、プログラム細胞死 1 (P D - 1) (例えば、ヒト P D - 1) に対して特異性を有する結合剤、並びに、例えば、感染症 (例えば、ヒト免疫不全ウイルス (H I V) による) 、がん及び / 又は自己免疫状態及び / 又は神経変性状態を治療、予防及び / 又は改善するためにそれを使用する方法に関する。P D - 1 と相互作用する結合剤を同定するための機能的アッセイも提供される。P D - 1 と P D - L 1 との相互作用をブロックする第 1 結合剤、及び P D - 1 と P D - L 1 との相互作用をブロックしない第 2 結合剤のような、結合剤の組合せも提供され、それらは T 細胞を疲弊から救済するために相乗的に作用する。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図 1】P D - 1 / P D - L 1 相互作用の阻害に関する抗体濃度反応曲線 (A ~ C) 。

【図 2】残基 33 ~ 149 からの P D - 1 タンパク質のエクトドメインの構造表示。P D - L 1 又は P D - L 2 のいずれかとの相互作用に関与するアミノ酸は、残基番号と共に紫の円で示す構造上の位置にある (残基番号は配列番号 275 に対応する (図 3 H)) 。

【図 3 A】P D - 1 エクトドメインのアミノ酸配列である。アミノ酸置換の標的となる残基を、31 の突然変異 (M 1 ~ M 31) のそれぞれについて示す。紫の文字で記載した残基は、P D - 1 / P D - L 1 相互作用に関係するアミノ酸に該当し、緑の文字で示すアスパラギン残基は N - 結合型グリコシル化の候補となる位置である。

【図 3 B】改変 P D - 1 ポリペプチドである。

【図 3 C】改変 P D - 1 ポリペプチドである。

【図 3 D】改変 P D - 1 ポリペプチドである。

【図 3 E】改変 P D - 1 ポリペプチドである。

【図 3 F】改変 P D - 1 ポリペプチドである。

【図 3 G】改変 P D - 1 ポリペプチドである。

【図 3 H】ヒト P D - 1 のアミノ酸配列 (配列番号 275) である。

【図 3 I】サル P D - 1 のアミノ酸配列である。

【図 4】一過性トランスフェクトされた H e L a 細胞の表面で発現された改変 P D - 1 タンパク質 M 13、M 14 及び M 23、並びに野生型 (W T) 対照 (配列番号 275) に対する、ブロッキング及び非ブロッキング抗 P D - 1 抗体の結合。

【図 5】一過性トランスフェクトされた H e L a 細胞の表面で発現された改変 P D - 1 タンパク質 M 13、M 23 及び M 4、並びに野生型 (W T) 対照 (配列番号 275) に対する、ブロッキング及び非ブロッキング抗 P D - 1 抗体の結合。

【図 6】一過性トランスフェクトされた H e L a 細胞の表面で発現された改変 P D - 1 タ

10

20

30

40

50

ンパク質 M 3 1、M 5 及び M 1 8、並びに野生型 (W T) 対照 (配列番号 2 7 5) に対する、ブロッキング及び非ブロッキング抗 P D - 1 抗体の結合。

【図 7】一過性トランスフェクトされた H e L a 細胞の表面で発現された改変 P D - 1 タンパク質 M 1、M 9、M 1 3、M 1 7、M 1 8、M 2 3、及び M 2 8、並びに野生型 (W T) 対照 (配列番号 2 7 5) に対する、ブロッキング及び非ブロッキング抗 P D - 1 抗体の結合。

【図 8】一過性トランスフェクトされた H e L a 細胞の表面で発現された改変 P D - 1 タンパク質 M 1 7、M 3 0 及び M 2 6、並びに野生型 (W T) 対照 (配列番号 2 7 5) に対する、ブロッキング及び非ブロッキング抗 P D - 1 抗体の結合。

【図 9】P D - 1 上の異なるエピトープに結合する 2 つのアンタゴニスト抗 P D - 1 抗体 (P D - 1 / P D - L 1 相互作用に一方はブロッキング性でもう一方は非ブロッキング性) の組合せは、いずれかの抗体単独で達成される程度を超えて、H I V 特異的 C D 8 T 細胞の機能的疲弊の救済を増強し及びその増殖を高める。

【図 1 0】個々のアンタゴニスト抗 P D - 1 抗体、並びに P D - 1 上の異なるエピトープに結合する 2 つのアンタゴニスト抗 P D - 1 抗体の組合せは、混合リンパ球反応アッセイにおいて、P D - 1 + メモリー C D 4 T 細胞の増殖 (a) 及び I F N 産生 (b) を高める。

【図 1 1 - 1】P D - 1 の進化的に保存されたパッチ P 1 (a) 及び P 2 (b) の構造表示。

【図 1 1 - 2】異なる種由来の P D - 1 エクトドメインのアミノ酸配列の整列 (c) 。

【図 1 2】活性化 C D 4 + T 細胞上の細胞表面 P D - 1 に対する抗体競合結合試験。

【図 1 3】部位特異的突然変異誘発及び抗体競合結合の結果の両方の組合せを用いた、P D - 1 構造に対する抗体結合部位のエピトープマッピング (a 及び b) 。

【図 1 4】抗 P D - 1 抗体単独又は I g G 対照抗体と対比した、抗 P D - 1 A D C で処理した際の、ウイルス血症 H I V 感染ドナー由来の P D - 1 高 C D 4 T 細胞における細胞死 (A q u a 染色 (a)) 又はアポトーシス (A n n e x i n (アネキシン) V 染色 (b)) の選択的増加。

【図 1 5】抗 P D - 1 抗体薬物コンジュゲート (A D C) 処理は、複数の異なるウイルス血症 H I V 感染ドナー由来の P D - 1 高 C D 4 + T 細胞におけるアポトーシス (A n n e x i n V 染色 (a)) 及び / 又は細胞死 (A q u a 染色 (b)) の増加をもたらす。抗 P D - 1 抗体単独又は I g G 1 対照抗体のいずれかで処理した対照サンプルでは、低い細胞死 / アポトーシスが観察される。

【図 1 6】慢性感染 H I V ドナー由来の P D - 1 陽性感染 C D 4 + T 細胞の抗 P D - 1 抗体薬物コンジュゲート (A D C) 媒介死滅の評価。抗体処理の 5 日後、細胞を定量的ウイルスアウトグロースアッセイで用いて、様々な処理サンプルでの感染性細胞の数をモニターした。

【図 1 7】1 3 7 F 2 (P D - 1 / P D - L 1 相互作用の) ブロッキング抗 P D - 1 抗体由来の重鎖及び軽鎖可変 C D R ループを含むヒト化抗体パネル (A 3 5 7 9 5、A 3 5 7 9 6、A 3 5 7 9 7、1 3 7 F 2 キメラ)、及び 1 3 5 C 1 2 (P D - 1 / P D - L 1 相互作用の) 非ブロッキング抗 P D - 1 抗体由来の重鎖及び軽鎖可変 C D R ループを含むヒト化抗体パネル (A 3 5 7 7 4、A 3 5 7 8 3、A 3 5 7 8 9、A 3 4 6 4 4 3、1 3 5 C H 2 L 2、1 3 5 C H 1 c L 1 c、1 3 5 C H 1 c L 1 b、1 3 5 C 1 2 キメラ) の機能活性は、機能的疲弊回復アッセイでの H I V ペプチド特異的 C D 8 T 細胞増殖の回復において M K 3 4 7 5 と同等のアンタゴニスト活性を示す

【図 1 8】P D - 1 上の異なるエピトープに結合する 2 つのアンタゴニスト抗 P D - 1 抗体 (P D - 1 / P D - L 1 相互作用に一方はブロッキング性 (M K 3 4 7 5 又は A 3 5 7 9 5) でもう一方は非ブロッキング性 (A 3 5 7 7 4)) の組合せは、いずれかの抗体単独で達成される程度を超えて、H I V 特異的 C D 8 T 細胞の機能的疲弊の救済を増強し及びその増殖を高める。

【図 1 9】P D - 1 上の異なるエピトープに結合する 2 つのアンタゴニスト抗 P D - 1 抗

10

20

30

40

50

体 (PD-1 / PD-L1 相互作用に一方はブロッキング性 (MK3475) でもう一方は非ブロッキング性 (135C H1cL1b 又は 135C H1cL1c)) の組合せは、いずれか一方の抗体単独で達成される程度を超えて、HIV 特異的 CD8⁺ T 細胞の機能的疲弊の救済を増強し及びその増殖を高める。

【図 20】TCR アクチベータ及び PD-L1 タンパク質を発現する一過性トランスフェクトされた 293T 細胞株での Jurkat PD-1 NFAT レポーター細胞株の刺激。A. MK3475 及び A35774。B. MK3475 及び 135C H1cL1c

【図 21】ブロッキング抗 PD-1 抗体、非ブロッキング抗 PD-1 抗体、又はブロッキング及び非ブロッキング抗 PD-1 抗体の組合せのいずれかを、慢性感染 HIV ドナー由来のメモリー T 細胞と共にインキュベートした際の細胞表面 PD-1 のインターナリゼーション (内在化)。メモリー CD4⁺ T 細胞 (a、c 及び e) 及びメモリー CD8⁺ T 細胞 (b、d 及び f) における PD-1 の細胞表面レベルを抗体処理後の様々な時間に測定した。

【図 22】PD-1 の高い基底レベルを有するメモリー T 細胞を保有する慢性感染 HIV ドナー由来の PBMC を、ブロッキング抗 PD-1 抗体 (MK3475)、非ブロッキング抗 PD-1 抗体 (A35774)、又はブロッキング及び非ブロッキング抗 PD-1 抗体の組合せ (A35774 及び MK3475) のいずれかと共にインキュベートし、その後、PD-L1 の存在下又は非存在下において TCR アクチベータ細胞で 24 時間刺激した。PD-L1 を発現する TCR アクチベータ細胞での刺激において、ブロッキング及び非ブロッキング抗 PD-1 抗体の組合せでの処理は、細胞培地中の IFN- γ レベル (A) 及び PD-1⁺ CD8⁺ T 細胞に関連する細胞内 IFN- γ レベル (B) を高める。

【図 23】hPD-1 / Fab A35774 複合タンパク質の結晶。A. ヒト PD-1 タンパク質と相互作用する A35774 の重鎖及び軽鎖 CDR ループ。B. ヒト PD-L1 (PDB 4ZQK) を用いた hPD-1 / Fab A35774 構造のモデリングは、非ブロッキング抗 PD-1 抗体が、PD-L1 と比べて PD-1 上の別個のオーバーラップしないエピトープに結合することを確認する。

【図 24】ヒト化 IgG4 非ブロッキング抗 PD-1 抗体 (135C H1cL1c)、ブロッキング抗 PD-1 抗体 キイトルーダ (登録商標) (Keytruda (登録商標)) (MK3475)、又は 135C H1cL1c + キイトルーダの組合せの治療有効性を評価するために、PD-1 HuGEMM マウスにおいて *In vivo* 有効性試験を実施した。(A) MC38 細胞の平均腫瘍体積を、様々な抗体処置と対比して、ビヒクル対照マウスについて示す。(B) ビヒクル単独対照に対する、抗体処置した場合の腫瘍増殖の平均パーセント阻害。(C) 移植した MC38 腫瘍の完全寛解を示した、各抗 PD-1 処置群におけるマウスの割合 (%)。

【図 25 A】137F2 可変重 (V_H) 鎖。

【図 25 B】137F2 可変軽 (V_L) 鎖。

【図 25 C】135C 可変重 (V_H) 鎖。

【図 25 D】135C 可変軽 (V_L) 鎖。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本開示は、*in vitro* 及び / 又は *in vivo* で、細胞表面上のプログラム細胞死 1 (PD-1) タンパク質 (例えば、参照により全体として本明細書に組み込まれる米国特許第 5,698,520 号明細書 (Honjo, et al.) の配列番号 1、図 1A、図 1B) (例えば、ヒト PD-1) に結合する結合剤に関する。その結合剤は、単離 PD-1 ポリペプチド (例えば、ヒト PD-1) 及び / 又はその断片及び / 又は誘導体にも、典型的には *in vitro* で、結合することができる。さらに、PD-1 を発現する細胞の存在に関連する 1 つ又は複数の疾患を診断、治療、予防及び / 又は改善するために、そのような結合剤を使用する方法も提供する。例えば、結合剤は、PD-1 のエピトープと反応できる及び / 又は PD-1 のエピトープに結合できる抗体 (例えば、モノク

10

20

30

40

50

ローナル抗体)であってよい。本明細書に記載される「結合剤」は、例えば、PD-1のアゴニスト又はアンタゴニストを含んでいてよい。アゴニスト結合剤は、典型的には、T細胞機能及び/又はPD-1の発現を回復させることのできない結合剤である。アゴニストPD-1結合剤は、PD-1発現細胞が疾患の進行に関与する、自己免疫疾患等を治療するのに有用となり得る。対照的に、アンタゴニスト結合剤は、T細胞機能を回復させ及び/又はPD-1の表面発現を低減させることができる結合剤である。例えば、PD-1アンタゴニスト結合剤は、HIV感染症及び様々な腫瘍において生じることが知られている機能的疲弊から、PD-1発現T細胞の機能を回復させることができるであろう。T細胞機能の回復は、例えば、そのような細胞の増殖、サイトカイン産生、細胞傷害活性又はその他の特徴を測定することによって特定することができる。本明細書に記載される結合剤の別の用途は、複製可能なHIV(例えば、潜伏及び/又は複製状態にある)を含むHIV感染CD4⁺T細胞集団の選択的標的化及び排除である。そのようなPD-1を発現するPD-1発現細胞は、複製可能なHIVのための主要細胞リザーブとして機能することが知られている。これらのCD4⁺T細胞集団を排除するための1つの可能なメカニズムは、本明細書に記載される結合剤(例えば、単一及び/又は二重特異性PD-1抗体)を使用する抗体依存性細胞傷害(ADCC)である。一部の実施形態では、PD-1発現に起因する機能的疲弊からの抗原特異的CD8⁺T細胞の救済(例えば、増殖、サイトカイン産生及び/又は細胞傷害活性の回復又は改善)をそれらの細胞において誘導するために、例えば、異なる特異性(例えば、異なるエピトープを認識する)を有する1つ又は複数のPD-1アンタゴニスト結合剤を組み合わせるとよい。一部の実施形態では、本明細書に記載される結合剤を、PD-1発現細胞の選択的排除及び/又は抑制のために提供してもよい。一部の実施形態では、本明細書に記載されるPD-1アゴニスト又はアンタゴニスト結合剤は、例えば、感染性疾患(例えば、HIV)、がん、及び/又は特に自己免疫状態を治療するためにPD-1発現細胞を抑制及び/又は排除するために使用してよい。その他の実施形態、使用などについては下記に記載する。

10

20

30

40

50

【0012】

結合剤は、例えば、表1に示すアミノ酸配列の任意の1つ又は複数(及び/又はそれらの1つ又は複数の断片及び/又は誘導体)を含みうる、例えばモノクローナル抗体などの抗体であってよい。本開示はさらに、PD-1を発現する細胞を単離する、同定する及び/又は標的とするためのそのようなモノクローナル抗体の使用を提供する。ある実施形態では、これらのモノクローナル抗体は、細胞表面に発現されたPD-1に対して反応性であってよい。用語「抗体」は、未精製形態又は部分精製形態(例えば、ハイブリドーマ上清、腹水、ポリクローナル抗血清)、或いは精製形態にある、全抗体又は断片化抗体を意味し得る。抗体は、例えば、マウス(例えば、マウスハイブリドーマ細胞によって生成される)を含む任意の好適な起源又は形態であってよく、或いは、ヒト化抗体、キメラ抗体、ヒト抗体などとして発現させてもよい。例えば、抗体は、完全に又は部分的にヒト(例えば、IgG(IgG1、IgG2、IgG2a、Ig2b、IgG3、IgG4)、IgM、IgA(IgA1及びIgA2)、IgD及びIgE)、イヌ(例えば、IgGA、IgGB、IgGC、IgGD)、ニワトリ(例えば、IgA、IgD、IgE、IgG、IgM、IgY)、ヤギ(例えば、IgG)、マウス(例えば、IgG、IgD、IgE、IgG、IgM)及び/又はブタ(例えば、IgG、IgD、IgE、IgG、IgM)、ラット(例えば、IgG、IgD、IgE、IgG、IgM)抗体に由来するものであってよい。様々なタイプの抗体を調製、利用及び保存する方法は当業者に周知であり、本発明を実施するのに好適であろう(例えば、Harlow, et al. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; Harlow, et al. *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Portable Protocol No. 1, 1998; Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495 (1975)); Jones et al. *Nature*, 321:522-525 (1986);

Riechmann et al. Nature, 332:323-329 (1988); Presta (Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992); Verhoeyen et al. (Science, 239:1534-1536 (1988); Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991); Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., J. Immunol., 147(1):86-95 (1991); Marks et al., Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368 856-859 (1994); Morrison, Nature 368 812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995); 並びに米国特許第4,816,567号明細書;同第5,545,807号明細書;同第5,545,806号明細書;同第5,569,825号明細書;同第5,625,126号明細書;同第5,633,425号明細書;同第5,661,016号明細書;及び同第9,090,994号明細書を参照)。ある用途では、抗体は、ハイブリドーマ上清又は腹水中に含まれていてよく、そのまま直接又は標準技術を用いた濃縮後のいずれで使用してもよい。他の用途では、抗体は、例えば、塩析による分画及びイオン交換クロマトグラフィ、或いはアガロースビーズなどの固体支持体に共有結合したプロテインA、プロテインG、プロテインA/G及び/又はプロテインL、及び/又は他のリガンドを用いたアフィニティークロマトグラフィーを使用して、さらに精製してよい。抗体は、冷凍製剤(例えば、-20°C又は-70°C)、凍結乾燥形態を含む任意の好適な形態で、又は通常のコールド条件(例えば、4°C)で保存してよい。例えば、液体形態で保存される場合、例えばトリス緩衝生理食塩水(TBS)又はリン酸緩衝生理食塩水(PBS)などの好適なバッファーを利用するのが好ましい。一部の実施形態では、結合剤は、非毒性の非経口的に摂取可能な希釈剤又は溶剤中の懸濁液のような、注射用製剤として調製することができる。利用できる好適なビヒクル及び溶剤として、特に、水、リンゲル液、及び等張塩化ナトリウム溶液、TBS及び/又はPBSが挙げられる。そのような製剤は、*in vitro*又は*in vivo*で使用するのに好適であり、当技術分野で知られているように調製することができ、正確な製剤は特定の用途に依存するであろう。

【0013】

しかしながら、本明細書に記載される結合剤は、決して抗体に限定されない。例えば、結合剤は、別のものと類似の結合特性を示す任意の化合物(例えば、模倣物)であってよい。例えば、代表的な結合剤は、PD-1に結合する、及び/又はそれに対する特異性を有する結合剤(モノクローナル抗体)と競合できる結合剤であってよい。一部の実施形態では、模倣物は、比較される結合剤(例えば、モノクローナル抗体)と、結合アッセイにおいて実質的に同一の親和性を示し得る。特定の結合剤の親和性は、限定はされないが、実施例において記載するような活性化CD4⁺T細胞での内因性細胞表面PD-1のFACS染色などの、任意の好適なアッセイによって測定することができる。1つの結合剤が、別の結合剤と測定値(例えば、ナノモル親和性での見かけの結合定数)が相互に約1~20、1~5、5~10、10~15、15~20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、又は250%のいずれかの範囲内にある場合は、別の結合剤と「実質的に同一の親和性」を有すると言うことができる。典型的な模倣物として、例えば、PD-1に特異的に結合する有機化合物、又はアフィボド

イ (Nygren, et al. FEBS J. 275 (11) : 2668 - 76 (2008))、アフィリン (Ebersbach, et al. J. Mol. Biol. 372 (1) : 172 - 85 (2007))、アフィチン (Krehenbrink, et al. J. Mol. Biol. 383 (5) : 1058 - 68 (2008))、アンチカリン (Skerra, A. FEBS J. 275 (11) : 2677 - 83 (2008))、アビマー (Silverman, et al. Nat. Biotechnol. 23 (12) : 1556 - 61 (2005))、DARPin (Stumpp, et al. Drug Discov. Today 13 (15 - 16) : 695 - 701 (2008))、フィノマー (Grabulovski, et al. J. Biol. Chem. 282 (5) : 3196 - 3204 (2007))、Kunitzドメインペプチド (Nixon, et al. Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 9 (2) : 261 - 8 (2006)) 及び/又はモノボディ (Koide, et al. Methods Mol. Biol. 352 : 95 - 109 (2007)) などが挙げられる。他の模倣物として、例えば、抗体の誘導体、例えば、Fab、Fab₂、Fab'一本鎖抗体、F_v、単ドメイン抗体、単一特異性抗体、二重特異性抗体、三重特異性抗体、多価抗体、キメラ抗体、イヌ-ヒトキメラ抗体、イヌ-マウスキメラ抗体、イヌFcを含む抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、イヌ化、CDRグラフト化抗体、 SAME抗体、ナノボディ、ラクダ抗体、マイクロボディ及び/又はイントラボディ又はそれらの誘導体が挙げられる。当業者に理解されるように、その他の結合剤もこの中で提供される。

10

20

30

40

50

【0014】

PD-1に対する特異性を有する(例えば、結合する)結合剤を作製するために、当業者に知られている任意の方法を使用してよい。例えば、モノクローナル抗体を作製及び単離するために、マウスなどの動物に1つ又は複数のPD-1タンパク質(例えば、PD-1 Fc融合タンパク質及び/又はPD-1 Hisタグタンパク質)を投与することができる。次に、抗PD-1ハイブリドーマ細胞株を作製するために、活性化ヒトTリンパ球で発現されたPD-1に対して(例えば、フローサイトメトリー及び/又は顕微鏡によって特定されるような)血清反応性を示す動物を選択する。これを、複数回ラウンドにわたり繰り返してよい。例えば、第1ラウンドの結合剤選択のための一次基準は:i)フローサイトメトリーによる活性化ヒトTリンパ球上のPD-1の染色レベル; (ii)既存の抗PD-1抗体と比較したCDR VH及びVL配列の多様性; 及び(iii)PD-L1と又はPD-1上の異なるエピトープに結合する数種の市販されている抗PD-1抗体結合の1つと事前結合させたPD-1コンジュゲートLuminoxビーズを用いた競合結合試験によって実施されるエピトープマッピング; を含んでいてよいが、それらに限定されない。典型的な第1又は第2ラウンドの選択は、例えば、親和性結合(抗PD-1抗体の刺激能力と相関しない可能性があるため一次基準ではない)、及び/又は結合剤をアゴニスト又はアンタゴニストとして同定するための機能的特性解析も含んでいてよい。

【0015】

本明細書の実施例1に記載するように、例えば、機能的疲弊回復アッセイ(Exhaustion Functional recovery assay)(EFRA)を使用できる。このアッセイでは、T細胞などの免疫細胞を疲弊から救済する能力について試験結合剤をアッセイすることができる。これは、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)のようなウイルスに由来する試験ペプチドなどの抗原の存在下において、そのような細胞に増殖を回復させる結合剤の能力を測定することによって特定できる。増殖は、例えば試験ペプチド単独のような対照、又は例えばMK-3475(ペンブロリズマブ)のような陽性対照である抗PD-1抗体と比較して、CFSEアッセイにおいて測定される。一部の実施形態では、その比較が、ペプチド単独対照又はアイソタイプ対照マウスIgG1抗体と共にペプチドを使用した場合と比較して、有意差(例えば、 < 0.001 のP値)を示す場合に、結合剤は増殖を回復させると特定される。このアッセイを用いて、PD-1への結合について他の結合剤(例えば、PD-L1又はPD-L2)と競合する及び/又は免疫細胞の機能的回復をもたらす結合剤(例えば抗体)を同定することができる。実施例1は、Luminox(登録商標)に基づく

アッセイを使用してこの中に記載されている（例えば、表3に列挙した）抗体をエピトープマッピングする2つの方法も記載する。1つの生化学的アッセイでは、PD-1 Fc融合タンパク質をビーズに結合させ、表3に記載されている抗PD-1抗体と2つの異なる市販の抗PD-1抗体の内の1つとの間で、競合結合試験を実施する。実施例1は、PD-1上の別個のエピトープに結合するモノクローナル抗体の4つのクラス：クラス1（PD-1とPD-L1との相互作用をブロックする第1モノクローナル抗体と競合的）、クラス2（PD-1に結合するがPD-1とPD-L1との相互作用をブロックしない第2モノクローナル抗体と競合的）、クラス3（第1及び第2モノクローナル抗体の両方と競合的）及びクラス4（第1及び第2抗体のいずれとも非競合的）を記載する。別個のアッセイにおいて、組換えPD-1タンパク質に対する結合についての競合を、表3に列挙する抗PD-1抗体とピオチン化PD-L1組換えタンパク質について評価した。EFRAにおいて増殖を誘導した抗体は、PD-1上の異なるエピトープに結合するとして提案された4つの結合クラスの全てから同定された。さらに、EFRAは、PD-1/PD-L1相互作用にブロッキング性又は非ブロッキング性のいずれかでありかつHIV特異的CD8⁺ T細胞に対する増殖機能を特異的に回復させた抗PD-1抗体の同定を可能にした。

10

20

30

40

50

【0016】

結合剤の組合せも同定することができる。一部の実施形態では、1つ又は複数の結合剤のみを使用して他の物質を使用しないで得られた結果と比較して統計的有意差をもたらす組合せを同定することができる。一部の実施形態では、免疫細胞機能を回復させる相乗的又は協働的能力を示す組合せを同定できる。一部の実施形態では、組合せは、PD-1とPD-L1との相互作用をブロックする第1結合剤を、PD-1とPD-L1との相互作用をブロックしない第2結合剤とともに含んでよい。第1及び第2結合剤は、例えば2種以上の異なるモノクローナル抗体又はそれらの誘導体などの異なる構成要素であっても、或いは、例えば二重機能性抗体（複数の結合特異性を有する単一抗体又はその誘導体）のような同一構成要素上に見いだされてもよい。例えば、典型的な二重機能性抗体は、PD-1とPD-L1との相互作用をブロックする第1結合領域、及びPD-1とPD-L1との相互作用をブロックしない第2結合領域を含んでよい。さらに、複数のタイプの各結合剤を提供する組合せも企図されている。例えば、組合せは、PD-1とPD-L1との相互作用をブロックしない1つ又は複数の結合剤とともに、PD-1とPD-L1との相互作用をブロックする複数のタイプの結合剤を含んでよい。一部の実施形態では、組合せは、PD-1とPD-L1との相互作用をブロックする複数の結合剤を、PD-1とPD-L1との相互作用をブロックしない複数の結合剤とともに含んでよい。本明細書に記載されているそのような組合せは、CTLA-4などに対する抗体のような、免疫細胞機能に影響し得る1又は複数の他の作用物質と組み合わせてもよい。当業者は、多数のそのような組合せが本明細書に記載される用途に好適となり得ることを認識できるであろう。

【0017】

結合剤が抗体である場合、その可変領域及び/又は相補性決定領域（「CDR」）に対応するヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列に関して、抗体を同定することができる。可変領域/CDR配列は、1つ又は複数の他の可変領域/CDRアミノ酸配列と組み合わせで使用できる。可変領域/CDRアミノ酸配列は、代りに及び/又はさらに、抗体分子の1つ又は複数のタイプの定常領域ポリペプチドに隣接させることができる。例えば、表1A及び1Bに示したCDRアミノ酸配列は、同一又は異なる種（例えば、ヒト、ヤギ、ラット、ヒツジ、ニワトリ）の任意の抗体分子の及び/又はそのCDRアミノ酸配列が由来する抗体サブタイプの、定常領域に隣接又は結合してよい。例えば、例示的な結合剤は、列挙されているハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体、又はそれに由来する、又はそれに関連するものでよく、及び/又は表3及び11~13に示されてい

るのとほぼ同一の親和性及び／又は増殖効果を有する、及び／又は同じ結合クラスを有するものでよく、及び／又は配列番号1～190のアミノ酸配列及び／又は表1A及び1Bに示すアミノ酸配列のいずれか1つ又は複数を有していてもよい。結合剤は、それぞれが1つ又は複数の定常領域及び／又は可変領域を含む抗体重鎖及び／又は軽鎖を含んでいてよい。可変領域は、典型的には、抗体の結合特異性を決定できる1つ又は複数のCDRを含んでいる。モノクローナル抗体は、そのような可変領域の（例えば、そのようなヌクレオチド配列によってコードされ得る）アミノ酸配列の解析によって同定することができる。例えば、PD-1に結合する結合剤の重鎖CDRの典型的なアミノ酸配列は、配列番号1～190からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸配列及び／又は表1A及び／又は1Bに示す任意の他の配列を含む1つ又は複数を含んでいてよい。本明細書に記載されるアミノ酸配列のいずれか及び／又はそれらの任意の断片及び／又は誘導体を、標準技術を使用して、任意の順序及び／又は組合せで任意の他の可変領域及び／又はCDRと結合させてハイブリッド及び／又は融合結合剤を形成する、及び／又は他の重鎖及び／又は軽鎖可変領域内に挿入してもよい。本開示のPD-1（例えば、ヒトPD-1）結合剤内に見られるCDRの典型的な組合せ（例えば、重鎖及び／又は軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3アミノ酸配列の組合せ）として、例えば、表1A及び／又は1Bに示す実施形態が挙げられる。

10

【0018】

【表 1 A】

表1A

クローン	重鎖:アミノ酸配列		
	CDR1	CDR2	CDR3
122F10	DDFLH (配列番号 1)	RIDPANGESRYAPKFQD (配列番号 24)	TDYRGYYYAMDY (配列番号 47)
139D6	NYYIH (配列番号 2)	SIYPNYGDTNYNQKVKD (配列番号 25)	GYSYAMDY (配列番号 48)
135D1	NYYIH (配列番号 3)	SIYPNYGETNYNQEFKG (配列番号 26)	GYSYAMDY (配列番号 49)
134D2	SNWMH (配列番号 4)	AVNPGNSDTTYNQKFKG (配列番号 27)	GRSYDGSFDY (配列番号 50)
121G1	RYWMH (配列番号 5)	NIDPSDSTTHYNPKFRD (配列番号 28)	DLDDFYVGSHEFDY (配列番号 51)
136B5	SNWMH (配列番号 6)	AVYPGNSDTTYNQNFKG (配列番号 29)	GRSYDGSFDY (配列番号 52)
127C2	NSYIH (配列番号 7)	WISPGDGSTNYNEKFKG (配列番号 30)	EEYDYDNY (配列番号 53)
137F2	NYWIG (配列番号 8)	DIYPGGGYTNYNEKFKG (配列番号 31)	GYDFVLDLDR (配列番号 54)
138H5	SYAMS (配列番号 9)	TISGGGADTYLDNVKG (配列番号 32)	QRGENLFAH (配列番号 55)
140A1	SDYAWN (配列番号 10)	YINYSGYTNYNPFLKS (配列番号 33)	YGGSYPWNFVDV (配列番号 56)
135H12	SYWIN (配列番号 11)	NIYPGSSSTDYNEKFKS (配列番号 34)	GLYWYFDV (配列番号 57)
131D11	SSYIH (配列番号 12)	WIFPGDGKTNYNEKFRD (配列番号 35)	NDFDRGVY (配列番号 58)
132F7	NHGMS (配列番号 13)	SINTGGYSTYYPDNVKG (配列番号 36)	DDYNWFAY (配列番号 59)
126E4	NYWIG (配列番号 14)	DIYPGSEYENYNEKFKG (配列番号 37)	GYDFVLDH (配列番号 60)
135G1	DSYIH (配列番号 15)	RIDPAHGNNVIYASKFRD (配列番号 38)	IYYDYGEGDF (配列番号 61)
136E10	DTYIH (配列番号 16)	RIDLANDDILYASKFQG (配列番号 39)	IYYDYGEGDY (配列番号 62)
135C12	NFYIH (配列番号 17)	SIYPNYGDTAYNQKFKD (配列番号 40)	GYSYAMDY (配列番号 63)
136F4	DSYIH (配列番号 18)	RIDPARDNIIYASKFRD (配列番号 41)	IYYDYGEGDY (配列番号 64)
136B4	DDFLH (配列番号 19)	RIDPANGESRYAPQFQD (配列番号 42)	TDYRGYYYAMDY (配列番号 65)
135E10	SYFMS (配列番号 20)	GISTGGADTYADSMKG (配列番号 43)	LSHYDGIPLDC (配列番号 66)
140G5	NHGMS (配列番号 21)	SISGGGDNTYYPDNLKG (配列番号 44)	VRQLGLHRAAMDY (配列番号 67)
122H2	NYWIG (配列番号 22)	DIYPGGDHKNYNEKFKD (配列番号 45)	GDFVLDY (配列番号 68)
139F11	SFAMS (配列番号 23)	TITGGGVNTYYPDTVKG (配列番号 46)	QAIYDGHYVLDY (配列番号 69)

10

20

30

40

【 0 0 1 9 】

【表 1 B】

表1B

クローン	軽鎖:アミノ酸配列		
	CDR1	CDR2	CDR3
122F10	KSSQSVLYSSNQKNYLA (配列番号 70)	WASTRES (配列番号 93)	HQYLSSYT (配列番号 116)
139D6	SASQGISDGLN (配列番号 71)	HTSTLHS (配列番号 94)	QQYSKFPLT (配列番号 117)
135D1	SASQGISNGLN (配列番号 72)	HTSTLHS (配列番号 95)	QQYSKFPLT (配列番号 118)
134D2	KASQDINKYIA (配列番号 73)	YTSTLRP (配列番号 96)	LQYDNLWT (配列番号 119)
121G1	RSSQSIVYSNGNTYLE (配列番号 74)	KVSHRFS (配列番号 97)	FQGSHVPYT (配列番号 120)
136B5	KASQDINKYMA (配列番号 75)	YTSTLRP (配列番号 98)	LQYDNLWT (配列番号 121)
127C2	KASQNVGTNVG (配列番号 76)	SASYRYN (配列番号 99)	QQYNTYPWT (配列番号 122)
137F2	KSSQSLFNSETQKNYLA (配列番号 77)	WASTRES (配列番号 100)	KQSYTLRT (配列番号 123)
138H5	LASQTIGTWLA (配列番号 78)	AATSLAD (配列番号 101)	QQLYSTPWT (配列番号 124)
140A1	RSSQTIVHNGDYLE (配列番号 79)	KISNRFF (配列番号 102)	FQGSHVPYT (配列番号 125)
135H12	KSSQSLFNSTGTRKNYLA (配列番号 80)	WASTRDS (配列番号 103)	KQSYNLYT (配列番号 126)
131D11	KASQNVDTNVA (配列番号 81)	SASYRYN (配列番号 104)	QQYNNYPYT (配列番号 127)
132F7	KSSQSLFNSTGTRKNYLA (配列番号 82)	WASTRES (配列番号 105)	QSDYSYPLT (配列番号 128)
126E4	KSSQSLFNSTGTRKSYLA (配列番号 83)	WASTRET (配列番号 106)	MQSYNLRT (配列番号 129)
135G1	HASQNINVWLS (配列番号 84)	KASNLHT (配列番号 107)	QQGQSWPLT (配列番号 130)
136E10	HASQNINVWLS (配列番号 85)	KASNLHT (配列番号 108)	QQGQSYPLT (配列番号 131)
135C12	SASQGISDGLN (配列番号 86)	HTSSLHS (配列番号 109)	QYYSKDLLT (配列番号 132)
136F4	HASQNINVWLS (配列番号 87)	KASNLHT (配列番号 110)	QQGQSWPLT (配列番号 133)
136B4	KSSQSVLYSSNQKNYLA (配列番号 88)	WASTRES (配列番号 111)	HQYLSSYT (配列番号 134)
135E10	RASESVDNSGVSFLT (配列番号 89)	AASNQGS (配列番号 112)	QQTKEVPWT (配列番号 135)
140G5	KASQSVSDDVS (配列番号 90)	SAFFRYP (配列番号 113)	QQDYSSPLT (配列番号 136)
122H2	KSSQSLFNSTGTRKNYLA (配列番号 91)	WASTRES (配列番号 114)	MQSFNLRT (配列番号 137)
139F11	RTSGNIHNYLA (配列番号 92)	NVKTLTD (配列番号 115)	QQFWSIPWT (配列番号 138)

10

20

30

40

【 0 0 2 0 】

好ましい実施形態では、各クローンの重鎖 C D R を、それらのそれぞれの軽鎖 C D R と組み合わせて結合剤とする。一部の実施形態では、結合剤は、下記に示す重鎖 C D R 及び軽鎖 C D R を含んでよい：

- 1 2 2 F 1 0 (配列番号 1、2 4、4 7、7 0、9 3、及び 1 1 6)；
- 1 3 9 D 6 (配列番号 2、2 5、4 8、7 1、9 4、及び 1 1 7)；
- 1 3 5 D 1 (配列番号 3、2 6、4 9、7 2、9 5、及び 1 1 8)；
- 1 3 4 D 2 (配列番号 4、2 7、5 0、7 3、9 6、及び 1 1 9)；
- 1 2 1 G 1 (配列番号 5、2 8、5 1、7 4、9 7、及び 1 2 0)；
- 1 3 6 B 5 (配列番号 6、2 9、5 2、7 5、9 8、及び 1 2 1)；

50

1 2 7 C 2 (配列番号 7、30、53、76、99、及び 1 2 2) ;
 1 3 7 F 2 (配列番号 8、31、54、77、100、及び 1 2 3) ;
 1 3 8 H 5 (配列番号 9、32、55、78、101、及び 1 2 4) ;
 1 4 0 A 1 (配列番号 10、33、56、79、102、及び 1 2 5) ;
 1 3 5 H 1 2 (配列番号 11、34、57、80、103、及び 1 2 6) ;
 1 3 1 D 1 1 (配列番号 12、35、58、81、104、及び 1 2 7) ;
 1 3 2 F 7 (配列番号 13、36、59、82、105、及び 1 2 8) ;
 1 2 6 E 4 (配列番号 14、37、60、83、106、及び 1 2 9) ;
 1 3 5 G 1 (配列番号 15、38、61、84、107、及び 1 3 0) ;
 1 3 6 E 1 0 (配列番号 16、39、62、85、108、及び 1 3 1) ;
 1 3 5 C 1 2 (配列番号 17、40、63、86、109、及び 1 3 2) ;
 1 3 6 F 4 (配列番号 18、41、64、87、110、及び 1 3 3) ;
 1 3 6 B 4 (配列番号 19、42、65、88、111、及び 1 3 4) ;
 1 3 5 E 1 0 (配列番号 20、43、66、89、112、及び 1 3 5) ;
 1 4 0 G 5 (配列番号 21、44、67、90、113、及び 1 3 6) ;
 1 2 2 H 2 (配列番号 22、45、68、91、114、及び 1 3 7) ; 又は
 1 3 9 F 1 1 (配列番号 23、46、69、92、115、及び 1 3 8) 。

10

この中に記載されている C D R の 1 つ又は複数を含む例示的な重鎖及び軽鎖可変領域は、限定はされないが、ヒト化重鎖及び / 又は軽鎖可変領域を含んでいてよい。例えば、1 3 7 F 2 重鎖 C D R (配列番号 8、31 及び 5 4) を含む例示的なヒト化「 1 3 7 F 2 」可変重鎖配列として、下記のもの挙げられる：

20

Q M Q L V Q S G P E V K K P G T S V K V S C K A S G F T F T N Y W I G W V R Q A
 P G Q A L E W M G D I Y P G G G Y T N Y N E K F K G R V T I T A D K S T S T A Y
 M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y D F V L D R W G Q G T T V T V S S (A 3
 5 7 9 0 - V H (配列番号 1 3 9)) ;

Q M Q L V Q S G P E V K K P G T S V K V S C K A S G F T F T N Y W I G W V R Q A
 P G Q A L E W M G D I Y P G G G Y T N Y N E K F K G R V T I T A D K S T S T A Y
 M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y D F V L D R W G Q G T T V T V S S (A 3
 5 7 9 6 - V H (配列番号 1 4 0)) ;

30

Q M Q L V Q S G P E V K K P G T S V K V S C K A S G F T F T N Y W I G W V R Q A
 P G Q A L E W M G D I Y P G G G Y T N Y N E K F K G R V T I T A D K S T S T A Y
 M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y D F V L D R W G Q G T T V T V S S (A 3
 5 7 9 3 - V H (配列番号 1 4 1)) ;

Q M Q L V Q S G P E V K K P G T S V K V S C K A S G F T F T N Y W I G W V R Q A
 P G Q A L E W M G D I Y P G G G Y T N Y N E K F K G R V T I T A D K S T S T A Y
 M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y D F V L D R W G Q G T T V T V S S (A 3
 5 8 1 8 - V H (配列番号 1 4 2)) ;

40

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y W I G W V R Q A
 P G Q G L E W M G D I Y P G G G Y T N Y N E K F K G R V T I T A D K S T S T A Y
 M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y D F V L D R W G Q G T T V T V S S (A 3
 5 7 9 5 - V H (配列番号 1 4 3)) ;

E V Q L V Q S G A E V K K H G E S L K I S C K G S G Y S F T N Y W I G W V R Q A
 T G Q G L E W M G D I Y P G G G Y T N Y N E K F K G R V T I T A D K S T S T A Y

50

M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y D F V L D R W G Q G T T V T V S S (A 3
5 7 9 7 - V H (配 列 番 号 1 4 4)) ;

Q M Q L V Q S G A E V K K T G S S V K V S C K A S G Y T F T N Y W I G W V R Q M
P G K G L E W M G D I Y P G G G Y T N Y N E K F K G R V T I T A D K S T S T A Y
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y D F V L D R W G Q G T T V T V S S (A 3
5 7 9 9 - V H (配 列 番 号 1 4 5)) ;

Q V Q L V Q S G S E L K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y W I G W V R Q A
P G K G L E W M G D I Y P G G G Y T N Y N E K F K G R V T I T A D K S T S T A Y
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y D F V L D R W G Q G T T V T V S S (A 3
5 8 0 5 - V H (配 列 番 号 1 4 6)) ;

10

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y W I G W V R Q A
P G Q G L E W M G D I Y P G G G Y T N Y N E K F K G R V T M T R D T S T S T V Y
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y D F V L D R W G Q G T L V T V S S (1 3
7 F V H 1 (配 列 番 号 1 4 7)) ;

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A A G Y T F T N Y W I G W V R Q A
P G Q G L E W M G D I Y P G G G Y T N Y N E K F K G R V T M T A D T S T S T V Y
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y D F V L D R W G Q G T L V T V S S (1 3
7 F V H 2 (配 列 番 号 1 4 8)) ;

20

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y W I G W V R Q A
P G Q G L E W I G D I Y P G G G Y T N Y N E K F K G R V T M T A D T S T S T V Y
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y D F V L D R W G Q G T L V T V S S (1 3
7 F V H 1 b (配 列 番 号 1 4 9)) ; 及 び / 又 は、

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y W I G W I R Q A
P G Q G L E W I G D I Y P G G G Y T N Y N E K F K G R A T L T A D T S T S T V Y
M E V S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y D F V L D R W G Q G T L V T V S S (1 3
7 F V H 1 c (配 列 番 号 1 5 0)) 。

30

1 3 7 F 2 軽鎖 C D R (配 列 番 号 7 7、 1 0 0 及 び 1 2 3) を 含 む 例 示 的 な ヒ ト 化 「 1
3 7 F 2 」 可 変 軽 鎖 配 列 と し て、 下 記 の も の が 挙 げ ら れ る :

D V V M T Q S P A F L S V T P G E K V T I T C K S S Q S L F N S E T Q K N Y L A
W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R E S G V P S R F S G S G S G T D F T L T
I S S L Q P E D F A T Y Y C K Q S Y T L R T F G G G T K L E I K (A 3 5 7 9 0 -
V L (配 列 番 号 1 5 1)) ;

40

D V V M T Q S P A F L S V T P G E K V T I T C K S S Q S L F N S E T Q K N Y L A
W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R E S G V P S R F S G S G S G T D F T L T
I S S L Q P E D F A T Y Y C K Q S Y T L R T F G G G T K L E I K (A 3 5 7 9 6 -
V L (配 列 番 号 1 5 2)) ;

D V V M T Q S P A F L S V T P G E K V T I T C K S S Q S L F N S E T Q K N Y L A
W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R E S G V P S R F S G S G S G T D F T F T
I S S L E A E D A A T Y Y C K Q S Y T L R T F G G G T K L E I K (A 3 5 7 9 3 -
V L (配 列 番 号 1 5 3)) ;

50

D V V M T Q S P A F L S V T P G E K V T I T C K S S Q S L F N S E T Q K N Y L A
 W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y W A S T R E S G V P S R F S G S G S G T D F T F T
 I S S L E A E D A A T Y Y C K Q S Y T L R T F G G G T K L E I K (A 3 5 8 1 8 -
 V L (配 列 番 号 1 5 4)) ;

D V V M T Q S P A F L S V T P G E K V T I T C K S S Q S L F N S E T Q K N Y L A
 W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y W A S T R E S G V P S R F S G S G S G T D F T L T
 I S S L Q P E D F A T Y Y C K Q S Y T L R T F G G G T K L E I K (A 3 5 7 9 5 -
 V L (配 列 番 号 1 5 5)) ;

10

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K S S Q S L F N S E T Q K N Y L A
 W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R E S G V P S R F S G S G S G T D F T L T
 I S S L Q P E D F A T Y Y C K Q S Y T L R T F G G G T K L E I K (A 3 5 7 9 7 -
 V L (配 列 番 号 1 5 6)) ;

D V V M T Q S P A F L S V T P G E K V T I T C K S S Q S L F N S E T Q K N Y L A
 W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R E S G V P S R F S G S G S G T D F T L T
 I S S L Q P E D F A T Y Y C K Q S Y T L R T F G G G T K L E I K (A 3 5 7 9 9 -
 V L (配 列 番 号 1 5 7)) ;

20

D V V M T Q S P A F L S V T P G E K V T I T C K S S Q S L F N S E T Q K N Y L A
 W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R E S G V P S R F S G S G S G T D F T F T
 I S S L E A E D A A T Y Y C K Q S Y T L R T F G G G T K L E I K (A 3 5 8 0 5 -
 V L (配 列 番 号 1 5 8)) ;

D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C K S S Q S L F N S E T Q K N Y L A
 W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F S G S G S G T D F T L T
 I S S L Q A E D V A V Y Y C K Q S Y T L R T F G Q G T K L E I K (1 3 7 F V L
 1 (配 列 番 号 1 5 9)) ;

30

D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I T C K S S Q S L F N S E T Q K N Y L A
 W Y Q Q K P G Q P P K L L I F W A S T R E S G V P D R F L G S G S G T D F T L T
 I S S L Q A E D V A V Y Y C K Q S Y T L R T F G Q G T K L E I K (1 3 7 F V L
 2 (配 列 番 号 1 6 0)) ;

D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C K S S Q S L F N S E T Q K N Y L A
 W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F S G S G S G T D F T L T
 I S S L Q A E D V A V Y Y C K Q S Y T L R T F G Q G T K L E I K (1 3 7 F V L
 1 b (配 列 番 号 1 6 1)) ;

40

D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I T C K S S Q S L F N S E T Q K N Y L A
 W Y Q Q K P G Q P P K L L I F W A S T R E S G V P D R F S G S G S G T D F T L T
 I S S L Q A E D V A V Y Y C K Q S Y T L R T F G Q G T K L E I K (1 3 7 F V L
 1 c (配 列 番 号 1 6 2)) ; 及 び / 又 は、

D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T M T C K S S Q S L F N S E T Q K N Y L A
 W Y Q Q K P G Q P P K L L I F W A S T R E S G V P D R F S G S G S G T D F T L T
 I S S V Q A E D V A V Y Y C K Q S Y T L R T F G Q G T K L E I K (1 3 7 F V L

50

1 d (配列番号 1 6 3)) 。

3 5 C 1 2 重鎖 C D R (配列番号 1 7、4 0 及び 6 3) を含む例示的なヒト化「1 3 5 C 1 2」可変重鎖配列として下記のもの挙げられる：

E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K I S C K G S G Y S F T N F Y I H W V R Q A
P G Q R L E W M G S I Y P N Y G D T A Y N Q K F K D R F V F S L D T S V S T A Y
L Q I S S L K A E D T A V Y Y C A R G Y S Y A M D Y W G Q G T T V T V S S (A 3
5 7 7 5 - V H (配列番号 1 6 4)) ;

10

E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K I S C K G S G Y S F T N F Y I H W V R Q A
R G Q R L E W I G S I Y P N Y G D T A Y N Q K F K D R F V F S L D T S V S T A Y
L Q I S S L K A E D T A V Y Y C A R G Y S Y A M D Y W G Q G T T V T V S S (A 3
5 7 8 3 - V H (配列番号 1 6 5)) ;

E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K I S C K G S G Y S F T N F Y I H W V R Q A
P G Q R L E W M G S I Y P N Y G D T A Y N Q K F K D R F V F S L D T S V S T A Y
L Q I S S L K A E D T A V Y Y C A R G Y S Y A M D Y W G Q G T T V T V S S (A 3
5 7 7 4 - V H (配列番号 1 6 6)) ;

20

E V Q L V Q S G A E V K K P G A T V K I S C K V S G Y T F T N F Y I H W V R Q A
R G Q R L E W I G S I Y P N Y G D T A Y N Q K F K D R V T I T A D K S T S T A Y
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y S Y A M D Y W G Q G T T V T V S S (A 3
6 4 4 3 - V H (配列番号 1 6 7)) ;

E V Q L V Q S G A E V K K P G A T V K I S C K V S G Y T F T N F Y I H W V R Q A
P G K G L E W M G S I Y P N Y G D T A Y N Q K F K D R V T I T A D K S T S T A Y
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y S Y A M D Y W G Q G T T V T V S S (A 3
5 7 7 7 - V H (配列番号 1 6 8)) ;

30

E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K I S C K G S G Y S F T N F Y I H W V R Q M
P G K G L E W M G S I Y P N Y G D T A Y N Q K F K D R V T I T A D K S T S T A Y
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y S Y A M D Y W G Q G T T V T V S S (A 3
5 7 8 9 - V H (配列番号 1 6 9)) ;

E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K I S C K G S G Y S F T N F Y I H W V R Q M
P G K G L E W M G S I Y P N Y G D T A Y N Q K F K D R F V F S L D T S V S T A Y
L Q I S S L K A E D T A V Y Y C A R G Y S Y A M D Y W G Q G T T V T V S S (A 3
6 4 4 8 - V H (配列番号 1 7 0)) ;

40

E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K I S C K G S G Y S F T N F Y I H W V R Q M
P G K G L E W M G S I Y P N Y G D T A Y N Q K F K D R F V F S L D T S V S T A Y
L Q I S S L K A E D T A V Y Y C A R G Y S Y A M D Y W G Q G T T V T V S S (A 3
6 4 3 7 - V H (配列番号 1 7 1)) ;

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N F Y I H W V R Q A
P G Q G L E W M G S I Y P N Y G D T A Y N Q K F K D R V T M T R D T S T S T V Y
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y S Y A M D Y W G Q G T L V T V S S (1 3
5 C V H 1 (配列番号 1 7 2)) ;

50

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N F Y I H W V R Q A
P G Q G L E W M G S I Y P N Y G D T A Y N Q K F K D R V T M T V D K S T S T V Y
M E L R S L R S E D T A V Y Y C A R G Y S Y A M D Y W G Q G T L V T V S S (1 3
5 C V H 2 (配列番号 1 7 3)) ;

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N F Y I H W V K Q A
H G Q G L E W M G S I Y P N Y G D T A Y N Q K F K D R V T M T V D K S T S T V Y
M E L R S L R S E D T A V Y Y C A R G Y S Y A M D Y W G Q G T L V T V S S (1 3
5 C V H 3 (配列番号 1 7 4)) ;

10

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N F Y I H W V R Q A
P G Q G L E W I G S I Y P N Y G D T A Y N Q K F K D R V T M T V D T S T S T V Y
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y S Y A M D Y W G Q G T L V T V S S (1 3
5 C V H 1 b (配列番号 1 7 5)) ;

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K M S C K A S G Y T F T N F Y I H W V R Q A
P G Q G L E W I G S I Y P N Y G D T A Y N Q K F K D R A T L T V D T S T S T A Y
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y S Y A M D Y W G Q G T L V T V S S (1 3
5 C V H 1 c (配列番号 1 7 6)) ; 及び / 又は、

20

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K M S C K A S G Y T F T N F Y I H W V R Q A
P G Q G L E W I G S I Y P N Y G D T A Y N Q K F K D R A T L T V D K S T S T A Y
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y S Y A M D Y W G Q G T L V T V S S (1 3
5 C V H 1 d (配列番号 1 7 7)) 。

1 3 5 C 1 2 軽鎖 C D R (配列番号 8 6、 1 0 9 及び 1 3 2) を含む例示的なヒト化「
1 3 5 C 1 2」可変軽鎖配列として下記のもの挙げられる：

D I Q M T Q S P S S V S A S V G D R V T I T C S A S Q G I S G D L N W Y Q Q K P
G Q A P R L L I Y H T S S L H S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
E D F A T Y Y C Q Y Y S K D L L T F G G G T K L E I K (A 3 5 7 7 5 - V L (配列
番号 1 7 8)) ;

30

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C S A S Q G I S G D L N W Y Q Q K P
G K T P K L L I Y H T S S L H S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
E D F A T Y Y C Q Y Y S K D L L T F G G G T K L E I K (A 3 5 7 8 3 - V L (配列
番号 1 7 9)) ;

D I Q M T Q S P S S V S A S V G D R V T I T C S A S Q G I S G D L N W Y Q Q K P
G K A P K L L I Y H T S S L H S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
E D F A T Y Y C Q Y Y S K D L L T F G G G T K L E I K (A 3 5 7 7 4 - V L (配列
番号 1 8 0)) ;

40

D I Q M T Q S P S S V S A S V G D R V T I T C S A S Q G I S G D L N W Y Q Q K P
G Q A P R L L I Y H T S S L H S G V P S R F S G S G S G T E F T L T I S R L E P
E D F A V Y Y C Q Y Y S K D L L T F G G G T K L E I K (A 3 6 4 4 3 - V L (配列
番号 1 8 1)) ;

D I Q M T Q S P S T L S A S V G D R V T I T C S A S Q G I S G D L N W Y Q Q K P
G Q A P R L L I Y H T S S L H S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P

50

EDFATYYCQYYSKDLLTFGGGTKLEIK (A35777 - VL (配列番号182)) ;

DIQMTQSPSSVSA SVGDRVTITCSASQGISGDLNWKQP
GQAPRLLIYHTSSLHSGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEP
EDFAVYYCQYYSKDLLTFGGGTKLEIK (A35789 - VL (配列番号183)) ;

DIQMTQSPSTLSAS SVGDRVTITCSASQGISGDLNWKQP
GKTPKLLIYHTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISRSLQP
EDFATYYCQYYSKDLLTFGGGTKLEIK (A36448 - VL (配列番号184)) ;

10

DIQMTQSPSTLSAS SVGDRVTITCSASQGISGDLNWKQP
GQAPRLLIYHTSSLHSGIPARFSGSGSGTDFTLTISRSLQP
EDFAVYYCQYYSKDLLTFGGGTKLEIK (A36437 - VL (配列番号185)) ;

DIQMTQSPSSLSAS SVGDRVTITCSASQGISGDLNWKQP
GKAPKLLIYHTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISRSLQP
EDFATYYCQYYSKDLLTFGGGTKLEIK (135C VL1 (配列番号186)) ;

20

DIQMTQSPSSLSAS SVGDRVTITCSASQGISGDLNWKQP
GKAVKLLIYHTSSLHSGVPLRFSGSGSGTDYTLTISRSLQP
EDFATYYCQYYSKDLLTFGGGTKLEIK (135C VL2 (配列番号187)) ;

DIQMTQSPSSLSAS SVGDRVTITCSASQGISGDLNWKQS
DGAVKLLIYHTSSLHSGVPLRFSGSGSGTDYTLTISRSLQP
EDFATYYCQYYSKDLLTFGGGTKLEIK (135C VL3 (配列番号188)) ;

30

DIQMTQSPSSLSAS SVGDRVTITCSASQGISGDLNWKQP
GKAPKLLIYHTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISRSLQP
EDFATYYCQYYSKDLLTFGGGTKLEIK (135C VL1b (配列番号189)) ; 及び / 又は、

DIQMTQSPSSLSAS SVGDRVTITCSASQGISGDLNWKQP
GKAVKLLIYHTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISRSLQP
EDFATYYCQYYSKDLLTFGGGTKLELK (135C VL1c (配列番号190)) 。

40

これらのアミノ酸配列をコードする例示的な核酸配列、及び / 又はそれを特定する方法もこの中に記載されている (例えば、配列番号191 ~ 243)。上記の或いはこの中に記載されている適合するヒト化可変配列の任意のものを互いに組み合わせて、PD-1に結合する抗体のような結合剤を提供してもよい。例えば、ある実施形態では、配列番号143及び155を組み合わせて結合剤にしてよく (例えばモノクローナル抗体 (mAb) A35795のように) ; 配列番号166及び180を組み合わせて結合剤にしてよく (例えばmAb A35774のように) ; 配列番号196及び189を組み合わせて結合

50

剤にしてよく（例えばmAb 135C H1cL1bのように）；配列番号196及び190を組み合わせると結合剤にしてよい（例えばmAb 135C H1cL1cのように）。さらに、表2に示すように、可変重鎖及び軽鎖が結合剤内に存在して（例えば結合して）もよい：

【0021】

【表2】

表2

例示的「ブロッキング」 ヒト化抗体の可変鎖			例示的「非ブロッキング」 ヒト化抗体の可変鎖		
抗体	配列番号	配列番号	抗体	配列番号	配列番号
A35790	139	151	A35575	164	178
A35796	140	152	A35783	165	179
A35793	141	153	A35774	166	180
A35818	142	154	A36443	167	181
A35795	143	155	A35777	168	182
A35797	144	156	A35789	169	183
A35799	145	157	A36448	170	184
A35805	146	158	A36437	171	185
137F V _H 1/V _L 1	147	159	135C V _H 1/V _L 1	172	186
137F V _H 2/V _L 2	148	160	135C V _H 2/V _L 2	173	187
137F V _H 1b/V _L 1b	149	161	135C V _H 3/V _L 3	174	188
137F V _H 1c/V _L 1c	150	162	135C V _H 1b/V _L 1b	175	189
137F V _H 1b/V _L 1d	149	163	135C V _H 1c/V _L 1c	176	190
			135C V _H 1d/V _L 1c	177	190

10

20

30

40

【0022】

「ブロッキング」抗体は、限定はされないが、例えばLuminox生化学的PD-1/PD-L1相互作用アッセイ（図1）などの任意の適したアッセイにより特定される、細胞表面上のPD-1への結合に関してPD-L1と競合するものである。ブロッキング抗PD-1抗体を用いて実施するエピトープマッピング試験は、PD-1/PD-L1相互作用とオーバーラップするPD-1の領域を位置づける。「非ブロッキング」抗体は、限定はされないが、例えばLuminox生化学的PD-1/PD-L1相互作用アッセイ（図1）などの適したアッセイにおいてPD-1への結合に関してPD-L1と部分的にしか競合しない又は全く競合しないものである。エピトープマッピング試験及び/又はヒトPD-1/F_{a,b}共結晶化試験は、非ブロッキング抗体が、PD-1/PD-L1相互作用とオーバーラップする部位ではPD-1と結合しないことを確認する。ある実施形態では、結合剤は、例えば、二重特異性抗体中にそのような配列の対を2組以上含んでよい（例えば、配列番号143及び155、並びに配列番号166及び180を組み合わせると結合剤又は結合剤の組合せにしてよい）。他の組合せも、当業者に確認されるように、有用となりうる。

【0023】

表1A及び/又は1BのCDRを含む結合剤、又はこの中に記載されている（例えば、配列番号139～190を含む及び/又は表2に示されている）結合剤は、下記の特徴を示し得る：

【0024】

【表 3】

表3

クローン	親和性* (nM)	結合 クラス**	PD-1/PD-L1 相互作用との 抗体競合***	EFRA ペプチド刺激単独に対する パーセンテージ(%)*
122F10	2.2	4	非ブロッキング	146%
139D6	2.4	2	非ブロッキング	195%
135D1	6.5	2	非ブロッキング	187%
134D2	4.8	4	ブロッキング	205%
121G1	11.9	4	非ブロッキング	120%
136B5	7.7	4	ブロッキング	200%
127C2	1.0	2	非ブロッキング	100%
137F2	1.5	1	ブロッキング	250%
138H5	1.6	3	ブロッキング	210%
140A1	1.4	3	ブロッキング	160%
135H12	1.9	1	ブロッキング	190%
131D11	2.7	1	ブロッキング	180%
132F7	100	2	非ブロッキング	210%
126E4	0.5	4	ブロッキング	130%
135G1	32	4	NA	138%
136E10	7.1	4	非ブロッキング	148%
135C12	1.7	2	非ブロッキング	195%
136F4	8.3	4	非ブロッキング	108%
136B4	1.4	2	非ブロッキング	185%
135E10	1.5	3	ブロッキング	165%
140G5	1.6	1	ブロッキング	205%
122H2	4.3	1	ブロッキング	200%
139F11	3.1	1	ブロッキング	250%

10

20

30

40

50

* 表 1 に列挙した抗体の結合親和性は、活性化 CD4 T 細胞上の内因性細胞表面 PD-1 の FACS 染色により評価した。

** 結合クラスは、Luminex アッセイ競合結合試験によって決定した。結合クラス 1 の mAb クローンは EH12.2H7 クローン市販抗体と競合的であり、クラス 2 の mAb クローンは J116 クローン市販抗体と競合的であり、クラス 3 の mAb クローンは EH12.2H7 抗体及び J116 抗体の両方と競合的であり、クラス 4 の mAb クローンは EH12.2H7 抗体及び J116 抗体の両方の存在下で結合する。

*** PD-1/PD-L1 相互作用との抗体競合は、第 2 の Luminex 結合アッセイにおいて決定した。このアッセイでは、PD-1 Fc 融合タンパク質被覆ビーズを、濃度 20nM の表 3 からの抗 PD-1 抗体の非存在下又は存在下でインキュベートした。次に PD-1/PD-L1 相互作用の IC₅₀ とほぼ同等である固定濃度の 1.25nM のビオチン化 PD-L1 を PD-1/抗体複合体とインキュベートし、フィコエリトリン標識ストレプトアビジンを使用して蛍光により PD-L1 結合を検出した。PD-1/抗体複合体への PD-L1 の結合に基づいて、抗体を、PD-1/PD-L1 相互作用にブロッキング性又は非ブロッキング性と定義した。

* 増殖作用は、CFSE アッセイ(機能的疲弊回復アッセイ「EFRA」)の1つの実施形態)を使用して評価する。慢性 HIV 感染した対象から単離した PBMC を、抗 PD-1 抗体の存在下及び非存在下で HIV 特異的ペプチドにより刺激した。6 日間のインキュベーション後、ペプチド単独対照と比較した HIV 特異的 CD8 T 細胞の増殖を抗 PD-1 処理サンプルにおいて評価した。

NA=利用不可(not available)

【 0 0 2 5 】

実施例で説明するように、エピトープマッピング試験は、「P 1」及び「P 2」と指定される、この中に記載されている結合剤が結合しうる PD - 1 上の少なくとも 2 つの保存されたパッチ(線形及び/又は立体構造エピトープを含む)を示した(例えば、図 1 1 a 及び 1 1 b を参照)。P 1 パッチは、進化的に保存されており、PD - 1 と PD - L 1 / PD - L 2 リガンドとの間の相互作用に關与する PD - 1 の中心領域に相当し、図 2 及び図 1 1 a において紫の円に該当する。第 2 の「パッチ」P 2 も進化的に保存されており、

P 1 パッチと同様の表面領域であるが異なるアミノ酸配列を占める (図 1 1 b)。P 2 は、PD - 1 における既に同定された構造的又は機能的役割を有していない。例えば 1 3 5 C 1 2 (配列番号 1 7、4 0、6 3、8 6、1 0 9、及び 1 3 2)、1 3 9 D 6 (配列番号 2、2 5、4 8、7 1、9 4、及び 1 1 7)、1 3 5 D 1 (配列番号 3、2 6、4 9、7 2、9 5、及び 1 1 8)、及び 1 3 6 B 4 (配列番号 1 9、4 2、6 5、8 8、1 1 1、及び 1 3 4) のアミノ酸配列を含む抗 PD - 1 抗体などの、この中に記載されている PD - 1 結合剤は、P 2 パッチとオーバーラップするエピトープに結合し、それによって PD - 1 のこの新たに同定された機能的領域の機能的重要性の直接の証拠を提供する。実施例は、図 3 に示される改変 PD - 1 ポリペプチド及び配列番号 2 4 4 ~ 2 7 4 を用いて実施したエピトープマッピング試験を記載する。これらの試験は、最も高い「機能的能力」又は「アンタゴニスト活性」を有する非ブロッキング抗体が、M 4 アミノ酸置換の領域 (セリン 3 8 をアラニンへ、プロリン 3 9 をアラニンへ、及びロイシン 4 1 をアラニンへ (図 3 ; 配列番号 2 4 7))、及び / 又は M 1 7 アミノ酸置換の領域 (アスパラギン 1 0 2 をアラニンへ、及びアルギニン 1 0 4 をアラニンへ (図 3 ; 配列番号 2 6 0))、及び / 又は M 1 8 アミノ酸置換の領域 (アスパラギン酸 1 0 5 をアラニンへ (図 3 ; 配列番号 2 6 1))、及び / 又は M 2 6 アミノ酸置換の領域 (アルギニン 1 3 8 をアラニンへ、及びグルタミン酸 1 4 1 をアラニンへ (図 3 ; 配列番号 2 6 9))、及び / 又は M 3 1 アミノ酸置換の領域 (ロイシン 4 1 をアラニンへ、及びバリン 4 3 をロイシンへ (図 3 ; 配列番号 2 7 4)) とオーバーラップする PD - 1 の「パッチ」に結合することを示した。この「パッチ」はこの中で「P 2」と称される。これらの試験は、P 2 が、そのような非ブロッキング抗体が結合する少なくとも 1 つのエピトープ (線形エピトープ、立体構造エピトープ、又はそれらの組合せを含む) を含むことを実証する。この領域が PD - 1 の機能活性に従来の関わりを持たないことを考えると、P 2 への結合が、PD - 1 へのアンタゴニスト活性が発揮されうる PD - 1 上の新規部位での新規な作用メカニズムを示すことをここで提案する。PD - 1 の P 2 領域と相互作用できる他の抗体、抗体断片、又は他のタンパク質結合剤も、PD - 1 / PD - L 1 相互作用の遮断を介して作用する抗 PD - 1 抗体とは区別されかつそれに相補的な態様で、PD - 1 アンタゴニストとして作用し得ることをさらに提案する。この中に記載されている結合剤は、例えば、今はまだ同定されていないリガンドと相互作用する ; PD - 1 の多量体化を干渉する、誘導する及び / 又は増強する ; 及び / 又は、P 2 と相互作用する (例えば結合する) ことにより、PD - 1 に関連する細胞内シグナル伝達を変化させる ; ものであってよい。従って、P 2 と相互作用する (例えば結合する) この中に記載されている結合剤は、これらのメカニズム又はまだ同定されるべき任意の他のメカニズムを介して PD - 1 アンタゴニスト機能を提供しうる。

【 0 0 2 6 】

従って、本開示は、細胞内又は細胞上の PD - 1 のこの P 2 パッチと相互作用させることにより PD - 1 の機能に影響を及ぼす方法を提供する。PD - 1 の P 2 パッチ内のアミノ酸残基は、トレオニン 3 6、フェニルアラニン 3 7、セリン 3 8、プロリン 3 9、ロイシン 4 1、バリン 4 3、アラニン 5 0、トレオニン 5 1、フェニルアラニン 5 2、トレオニン 5 3、システイン 5 4、セリン 5 5、アスパラギン 1 0 2、アルギニン 1 0 4、アスパラギン酸 (アスパラギン酸塩) 1 0 5、フェニルアラニン 1 0 6、ヒスチジン 1 0 7、メチオニン 1 0 8、アルギニン 1 3 8 及びグルタミン酸 (グルタミン酸塩) 1 4 1 を含んでいてよく、ここでアミノ酸の番号付けは配列番号 2 7 5 に対応する。ある実施形態では、P 2 パッチのアミノ酸残基は、トレオニン 3 6、フェニルアラニン 3 7、アラニン 5 0、トレオニン 5 1、フェニルアラニン 5 2、トレオニン 5 3、システイン 5 4、セリン 5 5、アスパラギン酸 (アスパラギン酸塩) 1 0 5、フェニルアラニン 1 0 6、ヒスチジン 1 0 7 及びメチオニン 1 0 8 を含んでいてよく、ここでアミノ酸の番号付けは配列番号 2 7 5 に対応する。ある実施形態では、P 2 パッチのアミノ酸残基は、アミノ酸残基 セリン 3 8、プロリン 3 9、ロイシン 4 1、バリン 4 3、アスパラギン 1 0 2、アルギニン 1 0 4、及び / 又はアスパラギン酸 (アスパラギン酸塩) 1 0 5 を含んでいてよい。従って、ある実施形態では、方法は、アミノ酸 トレオニン 3 6、フェニルアラニン 3 7、セリ

10

20

30

40

50

ン 38、プロリン 39、ロイシン 41、バリン 43、アラニン 50、トレオニン 51、フェニルアラニン 52、トレオニン 53、システイン 54、セリン 55、アスパラギン 102、アルギニン 104、アスパラギン酸（アスパラギン酸塩）105、フェニルアラニン 106、ヒスチジン 107、及び/又はメチオニン 108 と相互作用させることを含んでいてよく、ここでアミノ酸の番号付けは配列番号 275 に対応する。ある実施形態において、その方法は、アミノ酸 トレオニン 36、フェニルアラニン 37、アラニン 50、トレオニン 51、フェニルアラニン 52、トレオニン 53、システイン 54、セリン 55、アスパラギン酸（アスパラギン酸塩）105、フェニルアラニン 106、ヒスチジン 107 及び/又はメチオニン 108 と相互作用させることを含んでいてよい。ある実施形態では、その方法は、アミノ酸 セリン 38、プロリン 39、ロイシン 41、バリン 43、アスパラギン 102、アルギニン 104、及び/又はアスパラギン酸（アスパラギン酸塩）105 と相互作用させることを含んでいてよい。ある実施形態では、その方法は、P2 パッチ（例えば、上記のアミノ酸残基を含む PD-1 の部分）内の及び/又は P2 パッチとオーバーラップする任意のアミノ酸と相互作用させることを含む。そのような方法のある実施形態において、その方法は、配列番号 275 のセリン 38、プロリン 39、及び/又はロイシン 41 に対応する 1 つ又は複数のアミノ酸残基（M4；図 3；配列番号 247）；及び/又は配列番号 275 に関連してアスパラギン 102 及び/又はアルギニン 104 に対応する 1 つ又は複数のアミノ酸残基（M17；図 3；配列番号 260）；及び/又は配列番号 204 に関連してアスパラギン酸（アスパラギン酸塩）105 に対応する 1 つ又は複数のアミノ酸残基（M18；図 3；配列番号 261）；及び/又はアルギニン 138 及び/又はグルタミン酸（グルタミン酸塩）141 に対応する 1 つ又は複数のアミノ酸残基（M26；図 3；配列番号 269）及び/又はロイシン 41 及び/又はバリン 43 に対応する 1 つ又は複数のアミノ酸残基（M31；図 3；配列番号 274）と相互作用させることを含む。ある実施形態において、相互作用は、そのようなアミノ酸残基の任意の 1 つ又は複数を改変（例えば、置換、欠失）することにより低減及び/又は排除されうる。ある実施形態において、その方法は、PD-1 の機能に拮抗的に（antagonistically）影響を及ぼすことを含む。ある実施形態において、その方法は、PD-1 結合剤を用いて PD-1 と相互作用させることを含む。ある実施形態において、PD-1 結合剤は、例えば、配列番号 275 のロイシン 41 及び/又はバリン 43（M4）に対応するアミノ酸残基の 1 つ又は複数；及び/又は配列番号 275 に関連してアスパラギン 102 及び/又はアルギニン 104（M17）に対応する 1 つ又は複数のアミノ酸残基；を含む領域（例えばエピトープ）に特異性を有する。ある実施形態において、相互作用は、PD-1（配列番号 275）に結合する能力を有するが PD-1 M4（配列番号 247）には結合しない結合剤によって生じうる、及び/又は PD-1（配列番号 275）に結合する能力を有するが PD-1 M17（配列番号 260）には結合しない結合剤によって生じうる。ある実施形態において、その方法は、PD-1 と PD-L1 及び/又は PD-L2 との相互作用に参与する部位（例えば P1 パッチ）及び P2 で、PD-1 と相互作用させることを含んでいてよい。表現「配列番号 275 の」アミノ酸「に対応する 1 つ又は複数のアミノ酸残基」は、配列番号 275（図 3H）で見られるのと同様の位置にある、別のバージョンの PD-1 におけるアミノ酸を称する。しかしながら、当業者は、配列番号 275（図 3H）以外の PD-1 ポリペプチドにおけるあるアミノ酸が、ポリペプチド内のその文脈によって、配列番号 275（図 3H）における特定のアミノ酸に「対応する」として特定され得ることを理解するであろう。例えば、サルの PD-1（配列番号 276（図 3I））は、配列番号 275 と同様に位置 41 にロイシンを含む。しかし、別の PD-1 の番号付けは、その特定の PD-1 において「対応する」ロイシンが例えば位置 40 又は 43 に見られうるように、例えば 1 つ又は複数の付加、欠失及び/又は置換のせいで、異なっていてよい。しかしながら、そのロイシンは、（例えば、配列番号 275（図 3H）と同様にそれはアミノ酸 PA と LV で囲まれるといった）配列番号 275（図 3H）内のその文脈に関連してロイシン 41 に「対応する」ことが当業者に理解されるであろう。ある実施形態において、結合剤は、PD-1（配列番号 275）のアミノ酸 F37、P39、A40、

L 4 1、V 4 3、L 1 3 8、R 1 3 9、及び R 1 4 3；及び/又は P D - 1（配列番号 2 7 5）のアミノ酸 P 3 4、S 1 3 7、及び R 1 3 9 に結合する能力を有する（例えば A 3 5 7 7 4 は、V_H CDR ループに関して F 3 7、P 3 9、A 4 0、L 4 1、V 4 3、L 1 3 8、R 1 3 9 及び R 1 4 3、また V_L CDR ループに関して P 3 4、E 1 3 6、S 1 3 7 及び R 1 3 9 を含む）。当業者に理解されるように、そのような方法及びアミノ酸（例えば別のものに「対応する」もの）の他の実施形態もこの中で企図されている。

【0027】

結合親和性は、当業者が利用できる任意の技術によって特定できる。表 3 に示す結合親和性データは、フィットヘマグルチニン（PHA）を用いて 3 ~ 6 日間にわたり刺激した C D 4 T 細胞上の内因性細胞表面 P D - 1 のフローサイトメトリー染色によって評価した。結合クラスも、当業者が利用できる任意の技術によって特定できる。表 3 に提示した結合クラスデータは、Luminesx アッセイ競合結合試験によって特定した。表 3 において、結合クラス 1 のモノクローナル抗体は、E H 1 2 . 2 H 7 クローン市販抗体（Bio Legend 社、San Diego, CA から入手可能（例えば、製品番号 3 2 9 9 0 5））と競合的であると特定された抗体である；クラス 2 の抗体は、J 1 1 6 クローン市販抗体（Affymetrix eBioscience 社、San Diego, CA から入手可能（例えば、製品番号 1 6 - 9 9 8 9 - 8 0））と競合的であると特定された抗体である；クラス 3 の抗体は、E H 1 2 . 2 H 7 抗体及び J 1 1 6 抗体の両方と競合的であると特定された抗体である；及びクラス 4 のモノクローナル抗体クローン抗体は、E H 1 2 . 2 H 7 抗体及び J 1 1 6 抗体の両方の存在下で P D - 1 に結合すると特定された抗体である。

【0028】

増殖効果は、当業者が利用できる任意の技術によって特定できる。例えば、上述し、及び実施例 1 で使用した E F R A システムを使用できる。そのようなアッセイを使用して、表 3 に示す増殖効果データを特定した。簡単に説明すると、慢性 H I V 感染した対象から末梢血単核細胞（P B M C）を単離し、その細胞を抗 P D - 1 抗体の存在下及び非存在下において H I V 特異的ペプチドで刺激する、カルボキシフルオレセインスクシニミジルエステル（CFSE）アッセイである。対照抗 P D 1 抗体（Merck 社の抗体 M K - 3 4 7 5、ペムプロリズマブ又はキイトルーダ（登録商標）とも称される（米国特許第 8、3 5 4、5 0 9 号明細書、及び同第 8、9 0 0、5 8 7 号明細書に記載され、Merck & CO. から入手可能）；及び/又は R A S K G V S T S G Y S Y L H（配列番号 2 8 7）、L A S Y L E S（配列番号 2 8 8）、Q H S R D L P L T（配列番号 2 8 9）、N Y Y M Y（配列番号 2 9 0）、G I N P S N G G T N F N E K F K N（配列番号 2 9 1）、及び/又は R D Y R F D M G F D Y（配列番号 2 9 2）を含む）についても陽性対照として試験した。6 日間のインキュベーション後、H I V 特異的 C D 8 T 細胞の増殖を、ペプチド単独対照と比較して抗 P D - 1 処理サンプルにおいて評価し、対照を超えるパーセンテージとして結果を表わした（増殖効果）。

【0029】

一部の実施形態では、例えば抗体などの P D - 1 結合剤を同定及び特性付けるために使用される技術を、そのような結合剤を同定及び特性解析するためのシステムを提供するために組み合わせることができる。例えば、1 つ又は複数のモノクローナル抗体のような 1 つ又は複数の候補結合剤を、免疫原性ペプチドの存在下での増殖等によって測定されるような、免疫細胞に対して機能を回復させる候補結合剤の能力を特定するために、E F R A 又は類似のアッセイによってアッセイすることができる。一部の実施形態では、このタイプのアッセイは、さらに検討すべき候補結合剤が免疫細胞機能を回復させることができることを保証するための最初のスクリーンとして使用できる。一部の実施形態では、これらのタイプのアッセイの後に、例えば活性化末梢血単核細胞（P B M C）などの免疫細胞に対する結合親和性を特定するアッセイを実施することができる。一部の実施形態では、このアッセイは、例えば F A C S (fluorescence activated cell sorting) などの技術を使用してよい。一部の実施形態では、このアッセイは、非特異的結合の有無及び/又は抗 P

D1抗体（例えば、Merck社の抗体MK-3475）などの公知の結合剤を使用する競合結合試験を含んでよい。これらのアッセイに続き、例えば上記の表1A及び/又は1Bに提供するような候補結合剤のCDRのシーケンスを行ってよい。この中に記載されているEFRA、親和性特定、エピトープマッピング試験、及びCDR同定法は、一緒に、それらを用いて候補結合剤を同定できるシステムを提供する。

【0030】

表1A及び/又は1Bのアミノ酸配列のいずれか、及び/又は配列番号139～190のいずれか（及び/又は任意のそれらの1つ又は複数の断片及び/又は誘導体）はさらに、当業者が所望する任意の他のアミノ酸によって置換してよい。例えば、当業者は、特定のアミノ酸を下記の表4に示す他のアミノ酸で置き換えることによって保存的置換を行うことができる。選択される特定のアミノ酸置換は、選択される部位の位置に依存し得る。そのような保存的アミノ酸置換は、その位置でのアミノ酸残基のサイズ、極性、電荷、疎水性又は親水性への効果がほとんど又は全くないように、及び特に、PD-1結合の低減を生じさせないように、天然アミノ酸残基の非天然残基による置換を含んでよい。

【0031】

【表4】

表4

配列番号1～190の元のアミノ酸残基	配列番号1～190の元のアミノ酸残基の例示的な保存的置換	配列番号1～190の元のアミノ酸残基の好ましい保存的置換
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro, Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, 1,4 ジアミノ酪酸, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Gly
Ser (S)	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, ノルロイシン	Leu

【0032】

従って、この中に記載されている結合剤のアミノ酸配列中の、保存的又は非保存的なアミノ酸置換も企図されている。例えば、この中に記載されているヒト化可変重（V_H）鎖及び軽（V_L）鎖のアミノ酸配列（例えば、配列番号139～190）に対応するアミノ酸置換を行ってよい。例示的な非保存的及び保存的置換（表4を用いて同じものを説明できる）を、下記の表5～8（図25A～Dも参照）に示す：

【0033】

【表 5】

表5

A35790 V_H (137F2, 配列番号 139)に対応する例示的置換

A35790 V _H	Q1	M2	P9	P14	T16	V18	V20	S25	F27	V37	Q43
例示的置換	E*	V*	A** S*	H* T*	A* E* S**	L**	I**	A**	Y** T*	I**	K*
A35790 V _H	A44	M48	V68	I70	A72	K74	A79	L83	T112		
例示的置換	G*	I**	A**	M**	R*	T*	V**	V**	L*		

* 例示的な非保存的置換

**例示的な保存的置換

【 0 0 3 4 】

【表 6】

表6

A35790 V_L (137F2, 配列番号 151)に対応する例示的置換

A35790 V _L	V2	V3	A9	F10	S12	V13	T14	P15	E17	K18	V19	I21	T22
例示的置換	I**	Q*	S* D*	S*	A**	A**	S**	V* L*	D**	R**	A**	M**	N*
A35790 V _L	K51	Y55	S66	S69	L79	Q85	P86	F89	T91	G105			
例示的置換	R**	F**	D*	L*	F**	E*	A**	A** V**	V*	Q*			

* 例示的な非保存的置換

**例示的な保存的置換

【 0 0 3 5 】

【表 7】

表7

A35775 V_H (135C12, 配列番号 164)に対応する例示的置換

A35775 V _H	E1	E16	S17	L18	I20	G24	S28	P41	Q43	R44	M48	F68	V69
例示的置換	Q*	A*	T**	V**	V** M**	V* A**	T**	R* H*	K*	G*	I**	V** A**	T*
A35775 V _H	F70	S71	L72	T74	V76	A79	L81	Q82	I83	S84	K87	A88	T112
例示的置換	I** M* L**	T**	A** R* V**	K*	T*	V**	M**	E*	L**	R*	R**	S*	L*

* 例示的な非保存的置換

**例示的な保存的置換

【 0 0 3 6 】

【表 8】

表8

A35775 V_L (135C12, 配列番号 178)に対応する例示的置換

A35775 V _L	V11	P40	G41	Q42	A43	R45	S60	D70	F71	S77	Q79	T85	I106
例示的置換	L**	S*	D*	K* G*	T*	K**	A** L*	E**	Y**	R*	E*	V*	L**

* 例示的な非保存的置換

**例示的な保存的置換

10

20

30

40

50

【0037】

一部の実施形態では、本開示は、PD-1及び少なくとも1つの他の第2の抗原（例えば、細胞表面タンパク質）に単一結合剤が結合できるように、複数の特異性を有する結合剤を提供する。一部の実施形態では、第2の抗原は、感染性因子に感染した細胞によって発現される抗原であってよい。例えば、典型的な第2の抗原は、HIV Env抗原であってよい。そのような結合剤は、第2の抗原に結合できる及び/又は感染性因子を中和するように機能することができる。ある実施形態では、例えばPD-1及びHIV抗原（例えばEnv及び/又は他の抗原など）に対する二重特異性を有する二重特異性結合剤である。HIV免疫原は、この中に記載されたサブタイプ又は任意の他のサブタイプのいずれに由来するものであってもよい。一部の実施形態では、そのような結合剤は：PD-1アゴニスト/Env結合；PD-1アゴニストPD-1/Env結合及び中和；PD-1アンタゴニスト/Env結合；及び/又はPD-1アンタゴニスト/PD-1/Env結合及び中和を含み得る。様々なサブタイプの有病率を考えると、HIV-1サブタイプB及び/又はC由来の抗原を選択するのが好ましい場合がある。また、単一組成物中に、複数のHIVサブタイプ（例えば、HIV-1サブタイプB及びC、HIV-2サブタイプA及びB、又はHIV-1及びHIV-2サブタイプの組合せ）由来の抗原に特異性を有する結合剤を含めるのが望ましい場合もある。がんなどの疾患を治療するために、複数のPD-1特異性（例えば、2つの異なるエピトープに特異的な二重特異性PD-1a/PD-1bアンタゴニストPD-1抗体）及び/又はPD-1及び1つ以上の腫瘍抗原（例えば、がん精巢（CT）抗原（すなわち、MAGE、NY-ESO-1）；メラノサイト分化抗原（すなわち、Melan A/MART-1、チロシナーゼ、gp100）；突然変異抗原（すなわち、MUM-1、p53、CDK-4）；過剰発現「自己」抗原（すなわち、HER-2/neu、p53）；及び/又はウイルス抗原（すなわち、HPV、EBV））の両方に対する特異性を有する結合剤を得ることが有益となり得る。結合剤（例えば、モノクローナル抗体）は一般的に、上述したように作製することができる。そのような結合剤の特異性を、当業者に広く利用可能な技術を使用して、単一結合剤に再結合させてよい。一部の実施形態では、効果的な複数の特異性を有する試薬を提供するために、複数の単一特異性結合剤を組み合わせ使用（例えば、投与する）してもよい。

10

20

【0038】

一部の実施形態では、PD-1（及び/又は複数の特異性を有する結合剤の場合には別の抗原）を発現する細胞集団の機能を標的化及び阻害する、及び/又はその細胞集団を排除するために、本明細書に記載される結合剤を活性薬剤にコンジュゲートさせてもよい。例えば、複製可能なHIVを含むCD4⁺T細胞集団を、結合剤/薬物コンジュゲート（例えば、抗体-薬物コンジュゲート（ADC））を用いて、標的化及び排除することができる。単一及び/又は二重特異性候補結合剤は、1つ又は複数のタイプの薬物（例えば、DNAを損傷させる薬物、微小管を標的とする薬物）とコンジュゲートさせてよい。また、本明細書に記載される結合剤及び/又はそれらの誘導体は、in vitro及び/又はin vivoでの使用のために、機能的薬剤に隣接及び/又はコンジュゲートさせてもよい。例えば、結合剤を、細胞毒性薬又は毒素のような機能的成分、及び/又は例えばジフテリアA鎖、外毒素A鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、クルシン、クロチン、フェノマイシン、エノマイシンのようなそれらの活性断片に、隣接及び/又はコンジュゲートさせてよい。好適な機能的成分は、放射化学薬品を含んでいてよい。抗体のような結合剤は、当技術分野における標準技術を使用して、1又は複数の機能的薬剤に隣接及び/又はコンジュゲートさせることができる。

30

40

【0039】

一部の実施形態では、結合剤は、例えば抗感染剤（例えば、抗生物質、抗ウイルス薬）などの他の薬剤と共に投与することができる。例えば、本明細書に記載される結合剤は、モノクローナル抗体及び/又は他の試薬、例えばニボルマブ（MDX-1106、BMS-936558（Topalian, et al. N. Eng. J. Med. 2012; 366(26): 2443-2454）、MDX-1106、ONO-4538としても

50

知られている、Bristol-Myers Squibb社から入手できる完全ヒトIgG4モノクローナル抗体)、ペンプロリズマブ(MK-3475及びSCH 900475としても知られている、Merck社から入手できるヒト化IgG4モノクローナル抗体)、ピジリズマブ(CureTech社から入手できるヒト化IgG1モノクローナル抗体)、AMP-224(GlaxoSmithKline/Amplimmune社から入手できるB7-DC/IgG1融合タンパク質)、及び/又は米国特許第8,354,509B2号明細書(Carven, et al.)、米国特許第8,008,449号明細書(Korman, et al.)、国際公開第2012/135408A1号(Manoj, et al.)、米国特許出願公開第2010/026617号明細書(Carven, et al.)、国際公開第2011/110621A1号(Tyson, et al.)、米国特許第7,488,802B2号明細書(Collins, et al.)、国際公開第2010/029435A1号(Simon, et al.)、国際公開第2010/089411A2号(Olive, D.)、国際公開第2012/145493A1号(Langermann, et al.)、国際公開第2013/0435569A1号(Rolland, et al.)、国際公開第2011/159877A2号(Kuchroo, et al.)、米国特許第7,563,869B2号明細書(Ono Pharm.)、米国特許第7,858,746B2号明細書(Honjo, et al.)、米国特許第8,728,474B2号明細書(Ono Pharm.)、及び/又は米国特許第9,067,999号明細書(Ono Pharm.)のいずれかに記載された抗体又は他の試薬又は方法と組み合わせることができ、上記のそれぞれは参照により本開示に全体として組み込まれる。好ましい実施形態によると、PD-1結合剤の任意のものを他の結合剤に融合させて、二重特異性結合分子、特に二重特異性抗体を形成してもよい。そのような二重特異性分子は、PD1結合剤を、別のPD1結合剤と、或いはチェックポイント阻害因子又は調節因子(特に、CTLA-4、LAG3、TIM3、CD137、4-1BB、OX40、CD27、GITR(グルココルチコイド誘導腫瘍壊死因子)、CD40、KIR、IDOIL-2、IL-21及びCSF-1R(コロニー刺激因子1受容体))を標的とする別の結合剤と、有利に連結する。当業者に理解されるように、他の組合せ及び/又は二重特異性結合分子もこの中で企図されている。

【0040】

上述のように、本明細書に記載されるPD-1結合剤(例えば、PD-1アンタゴニスト)を、HIVによる感染症の症状を治療及び/又は予防及び/又は改善するために使用することができる。当技術分野でよく知られているように、HIV単離体は、現在では別個の遺伝子サブタイプに分類される。HIV-1は、少なくとも10のサブタイプ(A1、A2、A3、A4、B、C、D、E、F1、F2、G、H、J及びK)を含むことが知られている(Taylor et al, NEJM, 359(18):1965-1966(2008))。HIV-2は、少なくとも5つのサブタイプ(A、B、C、D及びE)を含むことが知られている。サブタイプBは、世界中の男性同性愛者及び静注薬物使用者におけるHIV流行と関連付けられてきた。大半のHIV-1免疫原、検査室適応単離体、試薬及びマッピングされたエピトープは、サブタイプBに属する。新規HIV感染症の発生率が高いサハラ以南のアフリカ、インド及び中国領域では、HIV-1サブタイプBはほんのわずかな感染の割合しか占めておらず、サブタイプHIV-1Cが最も一般的な感染サブタイプであると思われる。これらのタイプの単離体はいずれも、本明細書に記載される結合剤を使用して対処できるであろう。1つ又は複数の結合剤を、例えば、プロテアーゼ阻害剤、HIV侵入阻害剤、逆転写酵素阻害剤及び/又は抗レトロウイルスヌクレオシドアナログのような、HIVを予防、治療及び/又は改善するのに使用できる1又は複数の薬剤と一緒に又は共に投与してもよい。好適な化合物として、例えば、Agenerase(アンプレナビル)、Combivir(Retrovir/Epivir)、Crixivan(インジナビル)、Emtriva(エムトリシタピン)、Epivir(3tc/ラミブジン)、Epzicom、Fortovase/Invirase

(サキナビル)、Fuzeon(エンフビルチド)、Hivid(ddc/ザルシタピン)、Kaletra(ロピナビル)、Lexiva(ホスアンプレナビル)、Norvir(リトナビル)、Rescriptor(デラビルジン)、Retrovir/AZT(ジドブジン)、Reyatax(アタザナビル、BMS-232632)、Sustiva(エファビレンツ)、Trizivir(アパカビル/ジドブジン/ラミブジン)、Truvada(エムトリシタピン/テノホビルDF)、Videx(ddI/ジダノシン)、Videx EC(ddI、ジダノシン)、Viracept(ネビラピン)、Viread(テノホビルジソプロキシシルフマレート)、Zerit(d4T/スタブジン)及びZiagen(アパカビル)が挙げられる。その他の好適な薬剤は当業者に知られており、本明細書に記載する用途に好適となり得る。そのような薬剤は、本明細書に記載される結合剤の投与及び/又は方法の使用の前、間又は後のいずれに使用してもよい。

10

【0041】

上述のように、本明細書に記載されるPD-1結合剤(例えば、PD-1アンタゴニスト)は、がんの症状を治療及び/又は予防及び/又は改善するために使用することができる。例示的ながんとして、例えば、乳がん、血液がん、大腸がん、胃がん、結腸がん、骨格組織がん、皮膚がん(例えば、黒色腫)、脳腫瘍、肺がん、膀胱がん、腎臓がん、卵巣がん及び/又は肝臓がんなどが挙げられる。さらに、本明細書に記載されるPD-1結合剤は、好ましくはPD-1/PD-L1相互作用に非ブロック性である抗体であり、特に、限定はされないが、135C12、139D6、136B4及び135D1などの、この中で結合クラス2と称されるものが、単独で、或いはそれらを互いに及び/又は他のPD-1抗体と組み合わせて、様々なタイプの悪性腫瘍、特に、黒色腫(例えば、転移性悪性黒色腫)、腎臓がん(例えば、明細胞がん)、膀胱がん、前立腺がん(例えば、去勢抵抗性前立腺がん)、膵臓がん、乳がん、結腸がん、肺がん(例えば、非小細胞肺癌)、食道がん、頭頸部の扁平上皮がん、メルケル細胞がん、肝臓がん、卵巣がん、子宮頸がん、甲状腺がん、膠芽細胞腫、神経膠腫、白血病、リンパ腫、肉腫、及び他の新生物性悪性腫瘍などの治療に有用である。上記の好ましいPD-1結合剤は、例えばホジキン病、例えば濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫などの非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫(MM)、急性骨髄性白血病(AML)、急性リンパ球性白血病(ALL)、及び骨髄異形成症候群などの血液悪性腫瘍の治療に特に力が注がれている。この中に記載されている結合剤は、当業者に理解されるように、他のタイプのがんを治療するのにも使用してよい。

20

30

【0042】

一部の実施形態において、1つ又は複数のPD-1結合剤は、例えば、アルキル化剤(例えば、任意のナイトロジェンマスタード、ニトロソウレア、テトラジン、アジリジン、シスプラチン及び/又はそれらの誘導体)、代謝拮抗物質(例えば、メトトレキセート、ペメトレキセド、フルオロピリミジン及び/又はそれらの誘導体)、抗微小管薬(例えば、ピンカアルキロイド、タキサン、ポドフィロトキシン及び/又はそれらの誘導体)、トポイソメラーゼI及び/又はII阻害剤(例えば、カンプトテシン、イリノテカン、トポテカン、エトポシド、ドキシソルピシン、ミトキサントロン、テニポシド、ノボピオシン、メルパロン、アクラルピシン及び/又はそれらの誘導体)及び/又は細胞障害性抗生物質(例えば、任意のアントラサイクリン、アクチノマイシン、プレオマイシン、プリカマイシン及びマイトマイシン及び/又はそれらの誘導体)などの、がんを予防、治療及び/又は改善するのに使用される1又は複数の薬剤と組み合わせてもよく、及び/又はそれらと一緒に又は共に投与してもよい。さらに又は代りに、1つ又は複数の結合剤を、例えばニボルマブ、ペンブロリズマブ、ピジリズマブ及び/又はその他の類似の薬剤及び/又はそれらの誘導体などの、がんを治療する、予防する及び/又は改善するのに当業者が入手できる1つ又は複数の他の結合剤と組み合わせてもよい。1つ又は複数のPD-1結合剤を単独で、或いはPD-1、PD-L1及び/又は他の免疫チェックポイントエフェクターを標的とする他の結合剤と組み合わせて使用してもよい。これらを、他の抗腫瘍剤又は免疫原性剤(例えば、弱毒化がん細胞、腫瘍抗原(組換えタンパク質、ペプチド、及び糖分

40

50

子など)、例えば腫瘍由来抗原又は核酸でパルスされた樹状細胞のような抗原提示細胞、免疫刺激性サイトカイン(例えば、IL-2、IFN α 2、GM-CSF)、及び/又は免疫刺激性サイトカイン(例えば限定はされないが、GM-CSFなど)をコードする遺伝子でトランスフェクトした細胞);標準的がん治療(例えば、化学療法、放射線治療、又は外科手術);或いはVEGF、EGFR、Her2/neu、VEGF受容体、他の成長因子受容体に対する他の薬剤;と組み合わせ使用してもよい。好ましい実施形態によると、1つ又は複数のPD-1結合剤を、ワクチン剤及び/又は、特に、CTLA-4、LAG3、TIM3、CD137、4-1BB、OX40、CD27、GITR(グルココルチコイド誘導性腫瘍壊死因子)、CD40、KIR、IDOIL-2、IL-21及び/又はCSF-1R(コロニー刺激因子1受容体)に作用する免疫チェックポイント調節剤と組み合わせ、治療組成物及び/又は逐次治療投与のためのキットを形成する。その他の好適な薬剤は当業者に知られており、本明細書に記載する用途に好適となり得る。そのような薬剤は、本明細書に記載される結合剤の投与及び/又は方法の使用の前、間又は後のいずれでも使用できる。

10

【0043】

上述したように、本明細書に記載されるPD-1結合剤(例えば、PD-1アゴニスト)は、自己免疫の症状を治療及び/又は予防及び/又は改善するために使用できる。典型的な自己免疫状態には、例えば、全身性エリテマトーデス(SLE)、I型糖尿病、関節リウマチ、糸球体腎炎、及び多発性硬化症などの、PD-1が自己寛容を維持することに関係し及び/又は炎症性T細胞(例えば、自己反応性又は自己抗原特異的T細胞)を伴う任意の状態が含まれる。そのようなPD-1結合剤は、例えば抗CTLA-4薬剤(例えば、イピリムマブ)などの他の薬剤と組み合わせてもよい。1つ又は複数の結合剤を、例えば、グルココルチコイド剤、細胞増殖抑制剤(例えば、アルキル化剤、代謝拮抗物質、メトトレキサート、アザチオプリン、メルカプトプリン、細胞障害性抗生物質(例えば、ダクチノマイシン、アントラサイクリン、マイトマイシンC、プレオマイシン、ミトラマイシン)、抗体(例えば、Atgam、Thymoglobuline、Simulect、Zenapax)、イムノフィリン(例えば、シクロスポリン、タクロリムス、シロリムス)に作用する薬剤、インターフェロン、オピオイド剤、TNF結合剤(例えば、Remicade、Enbrel、Humira)、ミコフェノレート、フィンゴリモド、ミリオシン及び/又はそれらの誘導体のような、例えば自己免疫を予防、治療及び/又は改善するために使用できる1又は複数の薬剤と組み合わせる、及び/又は一緒に又は共に投与してもよい。その他の好適な薬剤は当業者に知られており、本明細書に記載する用途に好適となり得る。そのような薬剤は、本明細書に記載される結合剤の投与及び/又は方法の使用の前、間又は後のいずれでも使用できる。

20

30

【0044】

一部の実施形態では、結合剤を、1つ又は複数の検出可能な標識に隣接及び/又はコンジュゲートさせてよい。例えば、好適な検出可能な標識として、例えば、フルオロセイン(例えば、DyLight、Cy3、Cy5、FITC、HiLyte Fluor 555、HiLyte Fluor 647;5-カルボキシ-2,7-ジクロロフルオレセイン;5-カルボキシフルオレセイン(5-FAM);5-HAT(ヒドロキシトリプタミン);5-ヒドロキシトリプタミン(HAT);6-JOE;6-カルボキシフルオレセイン(6-FAM);FITC;6-カルボキシ-1,4-ジクロロ-2',7'-ジクロロフルオレセイン(TET);6-カルボキシ-1,4-ジクロロ-2',4',5',7'-テトラクロロフルオレセイン(HEX);6-カルボキシ-4',5'-ジクロロ-2',7'-ジメトキシフルオレセイン(JOE);Alexa fluor(例えば、350、405、430、488、500、514、532、546、555、568、594、610、633、635、647、660、680、700、750);BODIPY蛍光体(例えば、492/515、493/503、500/510、505/515、530/550、542/563、558/568、564/570、576/589、581/591、630/650-X、650/665-X、665/6

40

50

76、FL、FL ATP、FI - セラミド、R6G SE、TMR、TMR - Xコンジュゲート、TMR - X、SE、TR、TR ATP、TR - X SE)、ローダミン(例えば、110、123、B、B 200、BB、BG、B extra、5 - カルボキシテトラメチルローダミン(5 - TAMRA)、5 GLD、6 - カルボキシローダミン6G、リサミン、リサミンローダミンB、ファリシジン、ファロイジン、レッド、Rhod - 2、ROX(6 - カルボキシ - X - ローダミン)、5 - ROX(カルボキシ - X - ローダミン)、スルホローダミンB can C、スルホローダミンG Extra、TAMRA(6 - カルボキシテトラメチルローダミン)、テトラメチルローダミン(TRITC)、WT)、テキサスレッド及び/又はテキサスレッド - Xなどが挙げられる。当技術分野で知られている他の検出可能な標識も使用に好適となり得る。例えば抗体などの結合剤は、当技術分野における標準技術を使用して1又は複数の検出可能な標識に隣接及び/又はコンジュゲートさせることができる。

10

20

30

40

50

【0045】

ある実施形態では、本明細書に記載される1つ又は複数の結合剤をコードする核酸分子を、下記でより詳細に検討するように、1又は複数の発現ベクター内に挿入してよい。そのような実施形態では、結合剤は、アミノ酸配列に対応するヌクレオチドによってコードされ得る。様々なアミノ酸(AA)をコードするヌクレオチド(コドン)の特定の組合せは、当業者によって使用される様々な参考文献に記載されているように当技術分野においてよく知られている(例えば、Lewin, B. Genes V, Oxford University Press, 1994)。前記結合剤のアミノ酸をコードするヌクレオチド配列は、例えば、表9を参照して確認することができる。核酸変異体は、結合剤をコードするヌクレオチドの任意の組合せを使用してよい。

【0046】

【表9】

表9

配列番号1~138又はそれらの変異体のアミノ酸(AA)をコードするコドン

AA	コドン	AA	コドン	AA	コドン	AA	コドン	
Phe (F)	TTT	Ser (S)	TCT	Tyr (Y)	TAT	Cys (C)	TGT	
	TTC		TCC		TAC		TGC	
Leu (L)	TTA		Pro (P)	TCA	TERM	TAA	TERM	TGA
	TTG			TCG		TAG		Trp (W)
	CTT	CCT		His (H)	CAT	Arg (R)	CGT	
	CTC				CCC		CAC	CGC
CTA	CCA		CAA		CGA			
	CTG	CCG	Gln (Q)	CAG	CGG			
Ile (I)	ATT	Thr (T)	ACT	Asn (N)	AAT	Ser (S)	AGT	
	ATC		ACC		AAC		AGC	
	ATA		ACA	Lys (K)	AAA	Arg (R)	AGA	
Met (M)	ATG		ACG		AAG		AGG	
Val (V)	GTT	Ala (A)	GCT	Asp (D)	GAT	Gly (G)	GGT	
	GTC		GCC		GAC		GGC	
	GTA		GCA	Glu (E)	GAA		GGA	
	GTG		GCG		GAG		GGG	

【0047】

当業者は、特定のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を、表9(及び、一部の実施形態では、表5~8)に示すアミノ酸配列及び情報から容易に導き出せることを理解できる。例えば、アミノ酸配列DDFLH(配列番号1)及び表9に示す情報から、このアミノ酸配列が、ヌクレオチド配列GAT GAT TTT TTA CAT(配列番号191)によってコードされ得ることを推定することができる。当業者は、配列番号2~

190のいずれかをコードするヌクレオチド配列も同じやり方で推定することができ、そのようなヌクレオチド配列が本明細書で企図されていることを理解することができる。また、結合剤が抗体である場合、所定の調製物（例えば、ヒト化抗体）を作製するために、その可変領域をコードするヌクレオチド配列を、発現ベクター中にクローン化されたそれを発現するファージ及び/又はハイブリドーマ細胞から単離することができる。配列番号139～190の可変領域配列をコードする例示の核酸配列を表10に示す。

【0048】

【表 10 - 1】

表10

V _H /V _L 配列番号、 及び識別名	例示的な核酸(コード)配列
139 A35790-VH	cagatgcagctggtgcagagcggcccggaagtgaaaaaacgggcaccagcgtgaaagtg agctgcaaagcgagcggctttacctttaccaactattggattggctgggtgcgccaggcg ccgggccaggcgctggaatggatgggcgatatttatccgggcggcggctataccaactat aacgaaaaatttaaaggccgcgtgaccattaccgcggataaaaagcaccagcaccgcgtat atggaactgagcagcctgcgagcgaagataaccgcgggtgtattattgcgcgcgcggctat gattttgtgctggatcgctggggccagggcaccaccgtgaccgtgagcagc (配列番号 192)
140 A35796-VH	cagatgcagctggtgcagagcggcccggaagtgaaaaaacgggcaccagcgtgaaagtg agctgcaaagcgagcggctttacctttaccaactattggattggctgggtgcgccaggcg ccgggccaggcgctggaatggatgggcgatatttatccgggcggcggctataccaactat aacgaaaaatttaaaggccgcgtgaccattaccgcggataaaaagcaccagcaccgcgtat atggaactgagcagcctgcgagcgaagataaccgcgggtgtattattgcgcgcgcggctat gattttgtgctggatcgctggggccagggcaccaccgtgaccgtgagcagc (配列番号 193)
141 A35793-VH	cagatgcagctggtgcagagcggcccggaagtgaaaaaacgggcaccagcgtgaaagtg agctgcaaagcgagcggctttacctttaccaactattggattggctgggtgcgccaggcg ccgggccaggcgctggaatggatgggcgatatttatccgggcggcggctataccaactat aacgaaaaatttaaaggccgcgtgaccattaccgcggataaaaagcaccagcaccgcgtat atggaactgagcagcctgcgagcgaagataaccgcgggtgtattattgcgcgcgcggctat gattttgtgctggatcgctggggccagggcaccaccgtgaccgtgagcagc (配列番号 194)
142 A35818-VH	cagatgcagctggtgcagagcggcccggaagtgaaaaaacgggcaccagcgtgaaagtg agctgcaaagcgagcggctttacctttaccaactattggattggctgggtgcgccaggcg ccgggccaggcgctggaatggatgggcgatatttatccgggcggcggctataccaactat aacgaaaaatttaaaggccgcgtgaccattaccgcggataaaaagcaccagcaccgcgtat atggaactgagcagcctgcgagcgaagataaccgcgggtgtattattgcgcgcgcggctat gattttgtgctggatcgctggggccagggcaccaccgtgaccgtgagcagc (配列番号 195)
143 A35795-VH	caggtgcagctggtgcagagcggcgcggaagtgaaaaaacgggcgcgagcgtgaaagtg agctgcaaagcgagcggctataacctttaccaactattggattggctgggtgcgccaggcg ccgggccagggcctggaatggatgggcgatatttatccgggcggcggctataccaactat aacgaaaaatttaaaggccgcgtgaccattaccgcggataaaaagcaccagcaccgcgtat atggaactgagcagcctgcgagcgaagataaccgcgggtgtattattgcgcgcgcggctat gattttgtgctggatcgctggggccagggcaccaccgtgaccgtgagcagc (配列番号 196)
144 A35797-VH	gaagtgcagctggtgcagagcggcgcggaagtgaaaaaacatggcgaaagcctgaaaatt agctgcaaaggcagcggctatagctttaccaactattggattggctgggtgcgccaggcg accggccagggcctggaatggatgggcgatatttatccgggcggcggctataccaactat aacgaaaaatttaaaggccgcgtgaccattaccgcggataaaaagcaccagcaccgcgtat atggaactgagcagcctgcgagcgaagataaccgcgggtgtattattgcgcgcgcggctat gattttgtgctggatcgctggggccagggcaccaccgtgaccgtgagcagc (配列番号 197)
145 A35799-VH	cagatgcagctggtgcagagcggcgcggaagtgaaaaaacgggcagcagcgtgaaagtg agctgcaaagcgagcggctataacctttaccaactattggattggctgggtgcgccagatg ccgggcaaaggcctggaatggatgggcgatatttatccgggcggcggctataccaactat aacgaaaaatttaaaggccgcgtgaccattaccgcggataaaaagcaccagcaccgcgtat atggaactgagcagcctgcgagcgaagataaccgcgggtgtattattgcgcgcgcggctat gattttgtgctggatcgctggggccagggcaccaccgtgaccgtgagcagc (配列番号 198)

10

20

30

40

【 0 0 4 9 】

【表 1 0 - 2】

146 A35805-VH	caggtgcagctggtgcagagcggcagcgaactgaaaaaccgggocgcgagcgtgaaagtg agctgcaaagcgagcggctatacctttaccaactattggattggctgggtgcccaggcg ccgggcaaaggcctggaatggatggcgatatttatccgggocggcctataccaactat aacgaaaaatttaaggccgcgtgaccattaccgcggataaaagcaccagcaccgcgtat atggaactgagcagcctgocgagcgaagataaccgcggtgtattattgocgocggcctat gattttgtgctggatcgctggggccagggcaccaccgtgaccgtgagcagc (配列番号 199)	
147 137F VH1	caggtgcagctggtgcagagcggcgcggaagtgaaaaaccgggocgcgagcgtgaaagtg agctgcaaagcgagcggctatacctttaccaactattggattggctgggtgcccaggcg ccgggocaggcctggaatggatggcgatatttatccgggocggcctataccaactat aacgaaaaatttaaggccgcgtgaccatgaccgcgataccagcaccagcaccgtgtat atggaactgagcagcctgocgagcgaagataaccgcggtgtattattgocgocggcctat gattttgtgctggatcgctggggccagggcaccctggtgaccgtgagcagc (配列番号 200)	10
148 137F VH2	caggtgcagctggtgcagagcggcgcggaagtgaaaaaccgggocgcgagcgtgaaagtg agctgcaaagcggcgggctatacctttaccaactattggattggctgggtgcccaggcg ccgggocaggcctggaatggatggcgatatttatccgggocggcctataccaactat aacgaaaaatttaaggccgcgtgaccatgaccgcggataccagcaccagcaccgtgtat atggaactgagcagcctgocgagcgaagataaccgcggtgtattattgocgocggcctat gattttgtgctggatcgctggggccagggcaccctggtgaccgtgagcagc (配列番号 201)	20
149 137F VH1b	caggtgcagctggtgcagagcggcgcggaagtgaaaaaccgggocgcgagcgtgaaagtg agctgcaaagcgagcggctatacctttaccaactattggattggctgggtgcccaggcg ccgggocaggcctggaatggatggcgatatttatccgggocggcctataccaactat aacgaaaaatttaaggccgcgtgaccatgaccgcggataccagcaccagcaccgtgtat atggaactgagcagcctgocgagcgaagataaccgcggtgtattattgocgocggcctat gattttgtgctggatcgctggggccagggcaccctggtgaccgtgagcagc (配列番号 202)	20
150 137F VH1c	caggtgcagctggtgcagagcggcgcggaagtgaaaaaccgggocgcgagcgtgaaagtg agctgcaaagcgagcggctatacctttaccaactattggattggctggattcggcaggcg ccgggocaggcctggaatggatggcgatatttatccgggocggcctataccaactat aacgaaaaatttaaggccgcgcgaccctgaccgcggataccagcaccagcaccgtgtat atggaagtgagcagcctgocgagcgaagataaccgcggtgtattattgocgocggcctat gattttgtgctggatcgctggggccagggcaccctggtgaccgtgagcagc (配列番号 203)	30
151 A35790-VL	gatgtggtgatgaccagagcccggcgtttctgagcgtgaccocgggocgaaaaagtgacc attacctgcaaaagcagccagagcctgtttaacagcgaaccagaaaaactatctggcg tggtatcagcagaaaccgggocagccgcgaaactgctgatttattgggocgagcaccocg gaaagcggcgtgcccagccgctttagcggcagcggcagcggcaccgattttaccctgacc attagcagcctgagccggaagattttgacgacctattattgcaaacagagctataccctg cgcacctttggcggcggcaccaaactggaattaaa (配列番号 204)	
152 A35796-VL	gatgtggtgatgaccagagcccggcgtttctgagcgtgaccocgggocgaaaaagtgacc attacctgcaaaagcagccagagcctgtttaacagcgaaccagaaaaactatctggcg tggtatcagcagaaaccgggocagccgcgaaactgctgatttattgggocgagcaccocg gaaagcggcgtgcccagccgctttagcggcagcggcagcggcaccgattttaccctgacc attagcagcctgagccggaagattttgacgacctattattgcaaacagagctataccctg cgcacctttggcggcggcaccaaactggaattaaa (配列番号 205)	40
153 A35793-VL	gatgtggtgatgaccagagcccggcgtttctgagcgtgaccocgggocgaaaaagtgacc attacctgcaaaagcagccagagcctgtttaacagcgaaccagaaaaactatctggcg tggtatcagcagaaaccgggocagccgcgaaactgctgatttattgggocgagcaccocg gaaagcggcgtgcccagccgctttagcggcagcggcagcggcaccgattttacccttacc attagcagcctggaagcggagatgcccgcacctattattgcaaacagagctataccctg cgcacctttggcggcggcaccaaactggaattaaa (配列番号 206)	

【表 10 - 3】

154 A35818-VL	gatgtggtgatgacccagagcccggcgtttctgagcgtgacccgggcgaaaaagtgacc attacctgcaaaagcagccagagcctgtttaacagcgaaccagaaaaactatctggcg tggtatcagcagaaaccgggcccagggcgccgcgctgctgatttattgggcgagcaccgc gaaagcggcggtgccgagccgctttagcggcagcggcagcggcaccgattttacccttacc attagcagcctggaagcgaagatgcggcgacctattatgcaaacagagctataccctg cgcacctttggcggcgccaccaaactggaaattaaa (配列番号 207)	
155 A35795-VL	gatgtggtgatgacccagagcccggcgtttctgagcgtgacccgggcgaaaaagtgacc attacctgcaaaagcagccagagcctgtttaacagcgaaccagaaaaactatctggcg tggtatcagcagaaaccgggcccagggcgccgcgctgctgatttattgggcgagcaccgc gaaagcggcggtgccgagccgctttagcggcagcggcagcggcaccgattttaccctgacc attagcagcctgcagccgaagattttgcgacctattatgcaaacagagctataccctg cgcacctttggcggcgccaccaaactggaaattaaa (配列番号 208)	10
156 A35797-VL	gatattcagatgacccagagcccagcagcctgagcgcgagcgtgggcgatcgctgacc attacctgcaaaagcagccagagcctgtttaacagcgaaccagaaaaactatctggcg tggtatcagcagaaaccgggcccagccgcccgaactgctgatttattgggcgagcaccgc gaaagcggcggtgccgagccgctttagcggcagcggcagcggcaccgattttaccctgacc attagcagcctgcagccgaagattttgcgacctattatgcaaacagagctataccctg cgcacctttggcggcgccaccaaactggaaattaaa (配列番号 209)	
157 A35799-VL	gatgtggtgatgacccagagcccggcgtttctgagcgtgacccgggcgaaaaagtgacc attacctgcaaaagcagccagagcctgtttaacagcgaaccagaaaaactatctggcg tggtatcagcagaaaccgggcccagccgcccgaactgctgatttattgggcgagcaccgc gaaagcggcggtgccgagccgctttagcggcagcggcagcggcaccgattttaccctgacc attagcagcctgcagccgaagattttgcgacctattatgcaaacagagctataccctg cgcacctttggcggcgccaccaaactggaaattaaa (配列番号 210)	20
158 A35805-VL	gatgtggtgatgacccagagcccggcgtttctgagcgtgacccgggcgaaaaagtgacc attacctgcaaaagcagccagagcctgtttaacagcgaaccagaaaaactatctggcg tggtatcagcagaaaccgggcccagccgcccgaactgctgatttattgggcgagcaccgc gaaagcggcggtgccgagccgctttagcggcagcggcagcggcaccgattttacccttacc attagcagcctggaagcgaagatgcggcgacctattatgcaaacagagctataccctg cgcacctttggcggcgccaccaaactggaaattaaa (配列番号 211)	
159 137F VL1	gatattgtgatgacccagagcccggatagcctggcggtgagcctgggcgaaacgcgcgacc attaactgcaaaagcagccagagcctgtttaacagcgaaccagaaaaactatctggcg tggtatcagcagaaaccgggcccagccgcccgaactgctgatttattgggcgagcaccgc gaaagcggcggtgccggatcgcttttagcggcagcggcagcggcaccgattttaccctgacc attagcagcctgcaggcgaagatgtggcggtgtattatgcaaacagagctataccctg cgcacctttggccagggcaccaaactggaaattaaa (配列番号 212)	30
160 137F VL2	gatattgtgatgacccagagcccggatagcctggcggtgagcctgggcgaaacgcgcgacc attacctgcaaaagcagccagagcctgtttaacagcgaaccagaaaaactatctggcg tggtatcagcagaaaccgggcccagccgcccgaactgctgattttttgggcgagcaccgc gaaagcggcggtgccggatcgctttctgggagcggcagcggcaccgattttaccctgacc attagcagcctgcaggcgaagatgtggcggtgtattatgcaaacagagctataccctg cgcacctttggccagggcaccaaactggaaattaaa (配列番号 213)	
161 137F VL1b	gatattgtgatgacccagagcccggatagcctggcggtgagcctgggcgaaacgcgcgacc attaactgcaaaagcagccagagcctgtttaacagcgaaccagaaaaactatctggcg tggtatcagcagaaaccgggcccagccgcccgaactgctgatttattgggcgagcaccgc gaaagcggcggtgccggatcgcttttagcggcagcggcagcggcaccgattttaccctgacc attagcagcctgcaggcgaagatgtggcggtgtattatgcaaacagagctataccctg cgcacctttggccagggcaccaaactggaaattaaa (配列番号 214)	40
162 137F VL1c	gatattgtgatgacccagagcccggatagcctggcggtgagcctgggcgaaacgcgcgacc attacctgcaaaagcagccagagcctgtttaacagcgaaccagaaaaactatctggcg tggtatcagcagaaaccgggcccagccgcccgaactgctgattttttgggcgagcaccgc gaaagcggcggtgccggatcgcttttagcggcagcggcagcggcaccgattttaccctgacc attagcagcctgcaggcgaagatgtggcggtgtattatgcaaacagagctataccctg cgcacctttggccagggcaccaaactggaaattaaa (配列番号 215)	

【表 10 - 4】

163 137F VL1d	gatattgtgatgaccagagcccggatagcctggcggtgagcctgggCGAACGCGGACC atgacctgcaaaagcagccagagcctgtttaacagcgaaaccagaaaaactatctggcg tggtatcagcagaaaccgggCCAGCCGCGAAACTGCTGATTTTTGGGCGAGCACCCGC gaaagcggcgTCCGGATCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGACC attagcagcgtgcaggcgaagatgtggcggtgtattattgcaaacagagctataccctg cgcacctttggccagggcaccAAACTGGAAATTTAAA (配列番号 216)
164 A35775-VH	gtgcatgaagtgcagctggtgcagagcggcgCGGAAGTGAAAAACCGGGCGAAAGCCTG aaaattagctgcaaaaggcagcggctatagctttaccaacttttatattcattgggtgCGC caggcgccgggCCAGCGCCTGGAATGGATGGGCAGCATTATCCGAACTATGGCGATACC gcgtataaccagaaatttaaagatcgctttgtgtttagcctggataccagcgtgagcacc gcgtatctgcagattagcagcctgaaagcgaagataaccgCGGTGTATTATTGCGCGCGC ggctatagctatgcgatggattattggggCCAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGC (配 列番号 217)
165 A35783-VH	gaagtgcagctggtgcagagcggcgCGGAAGTGAAAAACCGGGCGAAAGCCTGAAAATT agctgcaaaaggcagcggctatagctttaccaacttttatattcattgggtgCGCCAGGCG cgCGGCCAGCGCCTGGAATGGATTGGCAGCATTATCCGAACTATGGCGATACCGCGTAT aaccagaaatttaaagatcgctttgtgtttagcctggataccagcgtgagcaccCGGTAT ctgcagattagcagcctgaaagcgaagataaccgCGGTGTATTATTGCGCGCGCGGCTAT agctatgcgatggattattggggCCAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGC (配列番号 218)
166 A35774-VH	gaagtgcagctggtgcagagcggcgCGGAAGTGAAAAACCGGGCGAAAGCCTGAAAATT agctgcaaaaggcagcggctatagctttaccaacttttatattcattgggtgCGCCAGGCG cggggCCAGCGCCTGGAATGGATTGGGCAGCATTATCCGAACTATGGCGATACCGCGTAT aaccagaaatttaaagatcgctttgtgtttagcctggataccagcgtgagcaccCGGTAT ctgcagattagcagcctgaaagcgaagataaccgCGGTGTATTATTGCGCGCGCGGCTAT agctatgcgatggattattggggCCAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGC (配列番号 219)
167 A36443-VH	gaagtgcagctggtgcagagcggcgCGGAAGTGAAAAACCGGGCGGACCGTGAAAATT agctgcaaaagtgcagcggctatacctttaccaacttttatattcattgggtgCGCCAGGCG cgCGGCCAGCGCCTGGAATGGATTGGCAGCATTATCCGAACTATGGCGATACCGCGTAT aaccagaaatttaaagatcgcgTgaccattaccgCGGATAAAAGCACCAGCACCGCGTAT atggaactgagcagcctgCGCAGCGAAGATAACCgCGGTGTATTATTGCGCGCGCGGCTAT agctatgcgatggattattggggCCAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGC (配列番号 220)
168 A35777-VH	gaagtgcagctggtgcagagcggcgCGGAAGTGAAAAACCGGGCGGACCGTGAAAATT agctgcaaaagtgcagcggctatacctttaccaacttttatattcattgggtgCGCCAGGCG cggggCAAAGGCCTGGAATGGATTGGGCAGCATTATCCGAACTATGGCGATACCGCGTAT aaccagaaatttaaagatcgcgTgaccattaccgCGGATAAAAGCACCAGCACCGCGTAT atggaactgagcagcctgCGCAGCGAAGATAACCgCGGTGTATTATTGCGCGCGCGGCTAT agctatgcgatggattattggggCCAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGC (配列番号 221)
169 A35789-VH	gaagtgcagctggtgcagagcggcgCGGAAGTGAAAAACCGGGCGAAAGCCTGAAAATT agctgcaaaaggcagcggctatagctttaccaacttttatattcattgggtgCGCCAGATG cggggCAAAGGCCTGGAATGGATTGGGCAGCATTATCCGAACTATGGCGATACCGCGTAT aaccagaaatttaaagatcgcgTgaccattaccgCGGATAAAAGCACCAGCACCGCGTAT atggaactgagcagcctgCGCAGCGAAGATAACCgCGGTGTATTATTGCGCGCGCGGCTAT agctatgcgatggattattggggCCAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGC (配列番号 222)
170 A36448-VH	gaagtgcagctggtgcagagcggcgCGGAAGTGAAAAACCGGGCGAAAGCCTGAAAATT agctgcaaaaggcagcggctatagctttaccaacttttatattcattgggtgCGCCAGATG cggggCAAAGGCCTGGAATGGATTGGGCAGCATTATCCGAACTATGGCGATACCGCGTAT aaccagaaatttaaagatcgctttgtgtttagcctggataccagcgtgagcaccCGGTAT ctgcagattagcagcctgaaagcgaagataaccgCGGTGTATTATTGCGCGCGCGGCTAT agctatgcgatggattattggggCCAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGC (配列番号 223)

10

20

30

40

【表 10 - 5】

171 A36437-VH	gaagtgcagctggtgcagagcggcgcggaagtgaaaaaacggggcgaaagcctgaaaatt agctgcaaaggcagcggctatagctttaccaacttttatattcattgggtgcgccagatg cggggcaaaggcctggaatggatgggcagcatttatccgaactatggcgataaccgcgat aaccagaaatttaaagatcgctttgtgttagcctggataccagcgtgagcaccgcgat ctgcagattagcagcctgaaagcgggaagataaccgcgggtgtattattgcgcgcgcggctat agctatgcatggattattggggccagggcaccaccgtgaccgtgagcagc (配列番号 224)	
172 135C VH1	caggtgcagctggtgcagagcggcgcggaagtgaaaaaacggggcgcgagcgtgaaagtg agctgcaaagcgagcggctatacctttaccaacttttatattcattgggtgcgccaggcg cggggccagggcctggaatggatgggcagcatttatccgaactatggcgataaccgcgat aaccagaaatttaaagatcgctgaccatgaccgcgataccagcaccagcaccgtgtat atggaactgagcagcctgcgagcgaagataaccgcgggtgtattattgcgcgcgcggctat agctatgcatggattattggggccagggcaccctggtgaccgtgagcagc (配列番号 225)	10
173 135C VH2	caggtgcagctggtgcagagcggcgcggaagtgaaaaaacggggcgcgagcgtgaaagtg agctgcaaagcgagcggctatacctttaccaacttttatattcattgggtgcgccaggcg cggggccagggcctggaatggatgggcagcatttatccgaactatggcgataaccgcgat aaccagaaatttaaagatcgctgaccatgaccgtggataaaagcaccagcaccgtgtat atggaactgagcagcctgcgagcgaagataaccgcgggtgtattattgcgcgcgcggctat agctatgcatggattattggggccagggcaccctggtgaccgtgagcagc (配列番号 226)	20
174 135C VH3	caggtgcagctggtgcagagcggcgcggaagtgaaaaaacggggcgcgagcgtgaaagtg agctgcaaagcgagcggctatacctttaccaacttttatattcattgggtgaaacaggcg catggccagggcctggaatggatgggcagcatttatccgaactatggcgataaccgcgat aaccagaaatttaaagatcgctgaccatgaccgtggataaaagcaccagcaccgtgtat atggaactgagcagcctgcgagcgaagataaccgcgggtgtattattgcgcgcgcggctat agctatgcatggattattggggccagggcaccctggtgaccgtgagcagc (配列番号 227)	20
175 135C VH1b	caggtgcagctggtgcagagcggcgcggaagtgaaaaaacggggcgcgagcgtgaaagtg agctgcaaagcgagcggctatacctttaccaacttttatattcattgggtgcgccaggcg cggggccagggcctggaatggattggcagcatttatccgaactatggcgataaccgcgat aaccagaaatttaaagatcgctgaccatgaccgtggataaccagcaccagcaccgtgtat atggaactgagcagcctgcgagcgaagataaccgcgggtgtattattgcgcgcgcggctat agctatgcatggattattggggccagggcaccctggtgaccgtgagcagc (配列番号 228)	30
176 135C VH1c	caggtgcagctggtgcagagcggcgcggaagtgaaaaaacggggcgcgagcgtgaaaatg agctgcaaagcgagcggctatacctttaccaacttttatattcattgggtgcgccaggcg cggggccagggcctggaatggattggcagcatttatccgaactatggcgataaccgcgat aaccagaaatttaaagatcgcgcgaccctgaccgtggataaccagcaccagcaccgcgat atggaactgagcagcctgcgagcgaagataaccgcgggtgtattattgcgcgcgcggctat agctatgcatggattattggggccagggcaccctggtgaccgtgagcagc (配列番号 229)	
177 135C VH1d	caggtgcagctggtgcagagcggcgcggaagtgaaaaaacggggcgcgagcgtgaaaatg agctgcaaagcgagcggctatacctttaccaacttttatattcattgggtgcgccaggcg cggggccagggcctggaatggattggcagcatttatccgaactatggcgataaccgcgat aaccagaaatttaaagatcgcgcgaccctgaccgtggataaaagcaccagcaccgcgat atggaactgagcagcctgcgagcgaagataaccgcgggtgtattattgcgcgcgcggctat agctatgcatggattattggggccagggcaccctggtgaccgtgagcagc (配列番号 230)	40
178 A35775-VL	gatattcagatgaccagagcccgagcagcgtgagcgcgagcgtggggcagatcgctgacc attacctgcagcgcgagccagggcattagcggcgatctgaaactggtatcagcagaaaccg ggccagggcgcgcctgctgatttatcaccagcagcctgcatagcggcgtgccgagc cgctttagcggcagcggcagcggcaccgattttaccctgaccattagcagcctgcagccg gaagattttgcgacctattattgccagtattatagcaaagatctgctgacctttggcggc ggcaccaaaactggaaattaaa (配列番号 231)	

【表 1 0 - 6】

179 A35783-VL	gatattcagatgaccagagcccagcagcctgagcgcgagcgtgggcgatcgcgtgacc attacctgcagcgcgagccagggcattagcggcgatctgaactggatcagcagaaaccg ggcaaaaccccgaaactgctgatttatcataccagcagcctgcatagcggcgtgccgagc cgctttagcggcagcggcagcggcaccgattttaccctgaccattagcagcctgcagccg gaagattttgcgacctattattgccagattatagcaaagatctgctgacctttggcggc ggcaccaaactggaattaaa (配列番号 232)	
180 A35774-VL	gatattcagatgaccagagcccagcagcgtgagcgcgagcgtgggcgatcgcgtgacc attacctgcagcgcgagccagggcattagcggcgatctgaactggatcagcagaaaccg ggcaaagcgcgaaactgctgatttatcataccagcagcctgcatagcggcgtgccgagc cgctttagcggcagcggcagcggcaccgattttaccctgaccattagcagcctgcagccg gaagattttgcgacctattattgccagattatagcaaagatctgctgacctttggcggc ggcaccaaactggaattaaa (配列番号 233)	10
181 A36443-VL	gatattcagatgaccagagcccagcagcgtgagcgcgagcgtgggcgatcgcgtgacc attacctgcagcgcgagccagggcattagcggcgatctgaactggatcagcagaaaccg ggccaggcgcgcgctgctgatttatcataccagcagcctgcatagcggcgtgccgagc cgctttagcggcagcggcagcggcaccgaattttaccctgaccattagccgctggaaccg gaagattttgcggtgtattattgccagattatagcaaagatctgctgacctttggcggc ggcaccaaactggaattaaa (配列番号 234)	
182 A35777-VL	gatattcagatgaccagagcccagcaccctgagcgcgagcgtgggcgatcgcgtgacc attacctgcagcgcgagccagggcattagcggcgatctgaactggatcagcagaaaccg ggccaggcgcgcgctgctgatttatcataccagcagcctgcatagcggcgtgccgagc cgctttagcggcagcggcagcggcaccgattttaccctgaccattagcagcctgcagccg gaagattttgcgacctattattgccagattatagcaaagatctgctgacctttggcggc ggcaccaaactggaattaaa (配列番号 235)	20
183 A35789-VL	gatattcagatgaccagagcccagcagcgtgagcgcgagcgtgggcgatcgcgtgacc attacctgcagcgcgagccagggcattagcggcgatctgaactggatcagcagaaaccg ggccaggcgcgcgctgctgatttatcataccagcagcctgcatagcggcattccggcg cgctttagcggcagcggcagcggcaccgattttaccctgaccattagccgctggaaccg gaagattttgcggtgtattattgccagattatagcaaagatctgctgacctttggcggc ggcaccaaactggaattaaa (配列番号 236)	
184 A36448-VL	gatattcagatgaccagagcccagcaccctgagcgcgagcgtgggcgatcgcgtgacc attacctgcagcgcgagccagggcattagcggcgatctgaactggatcagcagaaaccg ggcaaaaccccgaaactgctgatttatcataccagcagcctgcatagcggcgtgccgagc cgctttagcggcagcggcagcggcaccgattttaccctgaccattagcagcctgcagccg gaagattttgcgacctattattgccagattatagcaaagatctgctgacctttggcggc ggcaccaaactggaattaaa (配列番号 237)	30
185 A36437-VL	gatattcagatgaccagagcccagcaccctgagcgcgagcgtgggcgatcgcgtgacc attacctgcagcgcgagccagggcattagcggcgatctgaactggatcagcagaaaccg ggccaggcgcgcgctgctgatttatcataccagcagcctgcatagcggcattccggcg cgctttagcggcagcggcagcggcaccgattttaccctgaccattagcagcctgcagccg gaagattttgcggtgtattattgccagattatagcaaagatctgctgacctttggcggc ggcaccaaactggaattaaa (配列番号 238)	
186 135C VL1	gatattcagatgaccagagcccagcagcctgagcgcgagcgtgggcgatcgcgtgacc attacctgcagcgcgagccagggcattagcggcgatctgaactggatcagcagaaaccg ggcaaagcgcgaaactgctgatttatcataccagcagcctgcatagcggcgtgccgagc cgctttagcggcagcggcagcggcaccgattttaccctgaccattagcagcctgcagccg gaagattttgcgacctattattgccagattatagcaaagatctgctgacctttggcggc ggcaccaaactggaattaaa (配列番号 239)	40
187 135C VL2	gatattcagatgaccagagcccagcagcctgagcgcgagcgtgggcgatcgcgtgacc attacctgcagcgcgagccagggcattagcggcgatctgaactggatcagcagaaaccg ggcaaagcggtgaaactgctgatttatcataccagcagcctgcatagcggcgtgccgctg cgctttagcggcagcggcagcggcaccgattataccctgaccattagcagcctgcagccg gaagattttgcgacctattattgccagattatagcaaagatctgctgacctttggcggc ggcaccaaactggaattaaa (配列番号 240)	

【表 10 - 7】

188 135C VL3	gatattcagatgacccagagcccagcagcctgagcgcgagcgtgggcgatcgcgtgacc attacctgcagcgcgagccagggcatttagcggcgatctgaactggatcagcagaaaagc gatggcgcggtgaaactgctgatttatcataccagcagcctgcatagcggcgtgccgctg cgcttagcggcagcggcagcggcaccgattataccctgaccattagcagcctgcagccg gaagattttgcgacctattattgccagtattatagcaaagatctgctgacctttggcggc ggcaccaaactggaaattaaa (配列番号 241)
189 135C VL1b	gatattcagatgacccagagcccagcagcctgagcgcgagcgtgggcgatcgcgtgacc attacctgcagcgcgagccagggcatttagcggcgatctgaactggatcagcagaaaaccg ggcaaagcgcgaaactgctgatttatcataccagcagcctgcatagcggcgtgccgagc cgcttagcggcagcggcagcggcaccgattataccctgaccattagcagcctgcagccg gaagattttgcgacctattattgccagtattatagcaaagatctgctgacctttggcggc ggcaccaaactggaaattaaa (配列番号 242)
190 135C VL1c	gatattcagatgacccagagcccagcagcctgagcgcgagcgtgggcgatcgcgtgacc attacctgcagcgcgagccagggcatttagcggcgatctgaactggatcagcagaaaaccg ggcaaagcgcgtgaaactgctgatttatcataccagcagcctgcatagcggcgtgccgagc cgcttagcggcagcggcagcggcaccgattataccctgaccattagcagcctgcagccg gaagattttgcgacctattattgccagtattatagcaaagatctgctgacctttggcggc ggcaccaaactggaaactgaaaaaactgatgaaccgcagcgcagcaccgtgtggtattaa (配列番号 243)

10

【0055】

20

当業者に理解されるように、上記で用いた配列は、例えば、コドン最適化又は当業界で利用できる他の技術により、使用のために変更してよい。そのような調製物を作製する方法は、この中に記載され及び/又は当業者によく知られ及び利用可能である。

【0056】

関心のある可変領域（例えば、CDR）のアミノ酸配列を特定するために、PD-1抗原/免疫原で免疫したマウス由来のハイブリドーマ細胞を、本明細書に記載される機能的アッセイ及び当業者が容易に利用可能なクローニング技術を使用して選択する。例えば、選択されたハイブリドーマの重鎖及び軽鎖可変領域をコードする核酸を単離及びシーケンシングするために、製造業者のプロトコルにしたがってTRIzol試薬を使用して新鮮なハイブリドーマ細胞から全RNAを抽出する。cDNAは、標準技術を使用してRNAからアイソタイプ特異的アンチセンスプライマー又はユニバーサルプライマーを用いて（例えば、PrimeScript（商標）1st Strand cDNA合成キットの技術的マニュアルにしたがって）合成することができる。次に、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を実施して、選択されたハイブリドーマによって産生される抗体の（重鎖及び軽鎖）可変領域をコードする核酸を増幅することができ、次いでそれを標準クローニングベクター内に別個にクローン化してシーケンシングすることができる。次に、コロニーPCRスクリーニングを実施して、正しいサイズのインサートを有するクローンを同定することができる。好ましくは、正しいサイズのインサートを有する少なくとも5個の単一コロニーを、各抗体可変領域に関してシーケンシングする。次に、抗PD-1抗体の発現及び精製のために標準プロトコルを使用することができる。例えば、ハイブリドーマクローンを、無血清培地中で増殖させ、細胞培養ブロスを経心し、さらに濾過してよい。次に、抗体を含有する濾過上清を親和性カラム（例えば、プロテインAカラム）に装填し、洗浄し、さらに適切なバッファー（例えば、Pierce IgG溶出バッファー）を用いて溶出させてよい。溶出分画をプールし、PBS（pH7.2）中にバッファー交換してもよい。次に、分子量、収率及び純度に関して、標準プロトコルを使用して、SDS-PAGE及びウェスタンブロットによって精製抗体を解析することができる。次に、タンパク質凝集体の存在が少ない高抗体純度（通常、>90%）を確実にするために、生物物理学的特性解析のための適当なカラム（例えば、TSK GEL-G3000 SWXLカラム（Tosoh））においてサイズ排除クロマトグラフィHPLCを実施してよい。これらの手法を、選択された細胞及び他の起源由来の配列番号1~190をコードする核酸を単

30

40

50

離及びシーケンシングするのに使用した。これらの技術、その変形及び/又は他の技術も、当業者に理解できるようにこれらの目的に使用することができる。

【0057】

1つ又は複数のPD-1結合剤をコードする核酸分子は、ウイルス及び/又は非ウイルスベクター内に含まれていてよい。1つの実施形態では、DNAベクターが、1つ又は複数のPD-1結合剤をコードする核酸を患者に送達するために利用される。そうする場合に、そのようなメカニズムの効率を改善するために様々な戦略を利用でき、例えば、自己複製ウイルスレプリコン(Caley, et al. 1999. Vaccine, 17: 3124-2135; Dubensky, et al. 2000. Mol. Med. 6: 723-732; Leitner, et al. 2000. Cancer Res. 60: 51-55)、コドン最適化(Liu, et al. 2000. Mol. Ther., 1: 497-500; Dubensky, supra; Huang, et al. 2001. J. Virol. 75: 4947-4951)、in vivoエレクトロポレーション(Widera, et al. 2000. J. Immunol. 164: 4635-3640)、共刺激性分子、サイトカイン及び/又はケモカインをコードする核酸分子の組込み(Xiang, et al. 1995. Immunity, 2: 129-135; Kim, et al. 1998. Eur. J. Immunol., 28: 1089-1103; Iwasaki, et al. 1997. J. Immunol. 158: 4591-3601; Sheerlinck, et al. 2001. Vaccine, 19: 2647-2656)、例えばCpGなどの刺激性モチーフの組込み(Gurunathan, supra; Leitner, supra)、エンドサイトーシス又はユビキチンプロセッシング経路をターゲティングするための配列(Thomson, et al. 1998. J. Virol. 72: 2246-2252; Velders, et al. 2001. J. Immunol. 166: 5366-5373)、プライム-ブーストレジメン(Gurunathan, supra; Sullivan, et al. 2000. Nature, 408: 605-609; Hanke, et al. 1998. Vaccine, 16: 439-445; Amara, et al. 2001. Science, 292: 69-74)、プロテアソーム感受性開裂部位の使用、並びに例えばサルモネラ(Salmonella)などの粘膜送達ベクターの使用(Darji, et al. 1997. Cell, 91: 765-775; Woo, et al. 2001. Vaccine, 19: 2945-2954)などが挙げられる。他の方法は当技術分野において知られており、それらの一部について下記に記載する。宿主に核酸を導入するのにうまく利用されてきた様々なウイルスベクターとして、例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス(AAV)、ヘルペスウイルス及びポックスウイルスなどが挙げられる。当業者に広く利用可能な標準的な組換え技術を使用してベクターを構築することができる。そのような技術は、例えばMolecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook, et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press)、Gene Expression Technology (Methods in Enzymology, Vol. 185, edited by D. Goeddel, 1991. Academic Press, San Diego, CA)及びPCR Protocols: A Guide to Methods及びApplications (Innis, et al. 1990. Academic Press, San Diego, ca)などの一般的な分子生物学参考文献の中に見ることができる。「非ウイルス」プラスミドベクターも、所定の実施形態において好適となり得る。好ましいプラスミドベクターは、細菌、昆虫及び/又は哺乳動物宿主細胞と適合し得る。そのようなベクターとして、例えば、PCR-i i、PCR3及びpcDNA3.1 (Invitrogen, San Diego, CA)、pBSii (Stratagene, La Jolla, CA)、pet15 (Novagen, Madison, WI)、pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)、pEGFP-n2 (Clontech, Palo

10

20

30

40

50

Alto, CA)、pET1 (Bluebacci, Invitrogen)、pDSR - (国際公開第90/14363号)及びpFASTBACdual (Gibco-BRL, Grand island, NY)並びにBluescript (登録商標)プラスミド誘導体(高コピー数COLE1ベースのファージミド、Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA)、TAQ増幅PCR産物をクローニングするために設計されたPCRクローニングプラスミド(例えば、TOPO (商標)TA cloning (登録商標)キット、PCR2.1 (登録商標)プラスミド誘導体、Invitrogen, Carlsbad, CA)などが挙げられる。細菌ベクターも使用できる。そのようなベクターとして、例えば、シゲラ (Shigella)、サルモネラ (Salmonella)、ビブリオ・コレラ (Vibrio cholerae)、ラクトバチルス (Lactobacillus)、カルメット・ゲラン桿菌 (Bacille Calmette Guerin: BCG)及びストレプトコッカス (Streptococcus) (例えば、国際公開第88/6626号; 国際公開第90/0594号; 国際公開第91/13157号; 国際公開第92/1796号及び国際公開第92/21376号を参照されたい)などが挙げられる。多数の他の非ウイルスプラスミド発現ベクター及び発現系が当技術分野において知られており、使用できる。例えば、DNA-リガンド複合体、アデノウイルス-リガンド-DNA複合体、DNAの直接注入、CaPO₄沈降、遺伝子銃技術、エレクトロポレーション及びコロイド分散系などの、他の送達技術も差し支えない。コロイド分散系には、高分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズ及び水中油エマルジョン、ミセル、混合ミセル及びリボソームを含む脂質ベース系が含まれる。好ましいコロイド系は、in vitro及びin vivoでの送達ビヒクルとして有用な人工膜小胞であるリボソームである。RNA、DNA及び無傷ビリオンを水性内部にカプセル封入し、生物活性形態にある細胞に送達することができる (Fraleley, R., et al., 1981, Trends Biochem. Sci., 6: 77)。リボソームの組成は通常、ステロイド、特にコレステロールと組み合わせた、リン脂質、特に高相転移温度リン脂質の組合せである。その他のリン脂質又は他の脂質も使用できる。リボソームの物理的特性は、pH、イオン強度及び二価カチオンの存在に依存する。リボソーム作製において有用な脂質の例には、ホスファチジル化合物、例えばホスファチジルグリセロール、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴ脂質、セレブロシド及びガングリオシドなどが含まれる。特に有用なものは、脂質部分が、14~18個の炭素原子、特に16~18個の炭素原子を有し、かつ飽和している、ジアシルホスファチジルグリセロールである。例示的なリン脂質として、卵ホスファチジルコリン、ジバルミトイルホスファチジルコリン及びジステアロイルホスファチジルコリンが挙げられる。

【0058】

ベクターを含む培養細胞も提供される。培養細胞は、ベクターでトランスフェクトされた培養細胞又はその細胞の子孫であり、その細胞は免疫原性ポリペプチドを発現する。好適な細胞株は当業者に知られており、例えば、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC)を通して市販で入手可能である。トランスフェクトされた細胞を、免疫原性ポリペプチドを生成する方法において使用できる。その方法は、任意選択的に発現配列の制御下において、免疫原性ポリペプチドの発現を可能にする条件下でベクターを含む細胞を培養することを含む。免疫原性ポリペプチドは、標準のタンパク質精製法を使用して細胞又は培養培地から単離することができる。

【0059】

当業者は、本明細書に記載される結合剤(例えば、抗体)を使用して、それに結合するタンパク質を含有する生物学的サンプルを同定するための多数の好適な技術を有する。例えば、免疫沈降法又は他の捕捉タイプのアッセイを使用し、抗体を利用してPD-1を単離することができる。この周知技術は、固体支持体又はクロマトグラフィ材料(例えば、プロテインA、プロテインG及び/又はプロテインL)に抗体を付着させることによって実施される。次に、結合した抗体を、PD-1を含有する又は含有すると考えられる溶液

10

20

30

40

50

(例えば、HIV感染T細胞溶解物)中に導入する。それにより、PD-1は抗体に結合し、PD-1が抗体に結合したままである条件下で非結合物質を洗い流す。次に、結合タンパク質を抗体から分離し、所望の解析を行う。抗体を使用してタンパク質を単離する類似の方法は、当技術分野において周知である。結合剤(例えば、抗体)は、生物学的サンプル中のPD-1を検出するためにも利用できる。例えば、フローサイトメトリー解析、ELISA、免疫プロット(例えば、ウェスタンブロット)、*in situ*検出、免疫細胞化学及び/又は免疫組織化学などのアッセイにおいて、抗体を使用できる。そのようなアッセイを実施する方法は、当技術分野においてよく知られている。

【0060】

本明細書に記載される結合剤は、患者における疾患状態の存在を特定する、予後を予測する、或いは化学療法薬又は他の治療計画の有効性を特定するためにも使用できる。本明細書に記載するように又は当技術分野で知られているように実施される、発現プロファイルアッセイを用いて、PD-1の発現の相対レベルを特定することができる。次に、その発現レベルを基準(例えば、対照)レベルと関連させて、特定疾患が患者の体内に存在するか否か、患者の予後、又は特定の治療計画が有効であるか否かを特定することができる。例えば、患者が特定の抗感染症治療計画により治療されている場合、患者の組織(例えば、末梢血、乳腺組織生検)におけるPD-1の発現レベルの増加又は減少は、その治療計画が宿主内の感染性因子の量を悪化させる又は改善することを表すことができる。発現の増加又は減少は、治療計画が所望の効果を有する又は有さないこと、従って、別の治療法が選択され得ることを表すことができる。

【0061】

さらに、例えば、新規薬物候補を試験するための薬物スクリーニングアッセイにおける試薬として、本明細書に記載される結合剤を使用することも可能である。その試薬を使用して、細胞株、或いは患者の細胞又は組織における免疫原性標的の発現に対する、候補薬剤の効果を確認することができる。有用な化合物の迅速な同定を可能にし、及び候補薬剤を用いた治療の有効性をモニターするために、発現プロファイリング技術を高スループットスクリーニング技術と組み合わせてもよい(例えば、Zlokarnik, et al., *Science* 279, 84-8 (1998))。候補薬剤は、化学的化合物、核酸、タンパク質、抗体、又はそれらの誘導体であってよく、天然のもの又は合成由来のものいずれであってもよい。このように同定された候補薬剤は、例えば、患者に投与するための医薬組成物として、又は他のスクリーニングアッセイにおいて使用するために利用することができる。

【0062】

一部の実施形態では、結合剤は精製形態にある。「精製」結合剤(例えば、抗体)は、(例えば、モノクローナル抗体の場合、ハイブリドーマ上清又は腹水調製物の一部として)最初に一緒に含まれるタンパク質及び/又は他の成分の少なくとも約50%から分離されたものであってよい。精製結合剤(例えば、抗体)は、最初に一緒に含まれるタンパク質及び/又は他の成分の少なくとも約50%、60%、75%、90%又は95%から分離されたものであってよい。

【0063】

本明細書に記載されるポリペプチド及び核酸は、宿主に投与する前に1つ又は複数の医薬上許容される担体と組み合わせる。医薬上許容される担体は、生物学的又は他の点で望ましくない物質ではなく、例えば、その物質は、いずれの望ましくない生物学的影響も生じることなく、又はそれが含まれる医薬組成物の他の成分のいずれとも有害に相互作用することなく、対象に投与することができる。担体は必然的に、当業者に周知であるように、有効成分の分解を最小限に抑え、及び対象における有害副作用を最小限に抑えるように選択されるであろう。好適な医薬担体及びそれらの調製物は、例えば、Remington's: The Science及びPractice of Pharmacy, 21st Edition, David B. Troy, ed., Lippincott Williams & Wilkins (2005)に記載されている。典型的には、調製物

を等張にするために調製物中で適切な量の医薬上許容される塩が使用される。医薬上許容される担体の例には、無菌水、食塩液、リンゲル液及びデキストロス溶液のような緩衝液が含まれるがそれらに限定されない。溶液のpHは、一般に約5～8又は約7～約7.5である。その他の担体には、例えばポリペプチド又はそれらの断片を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスのような、徐放性製剤が含まれる。マトリックスは、成形品、例えば、フィルム、リポソーム又は微粒子の形態にあってよい。所定の担体が、例えば、投与経路及び投与される組成物の濃度に依存して、より好ましいものとなり得ることは当業者に明白であろう。担体は、ヒト又は他の対象にポリペプチド及び/又はその断片を投与するのに好適なものである。医薬組成物は、免疫原性ポリペプチドに加えて、担体、増粘剤、希釈剤、保存料、界面活性剤、アジュバント、免疫刺激剤も含んでよい。医薬組成物は、抗菌剤、抗炎症剤及び麻酔剤などの1又は複数の有効成分も含んでよい。医薬組成物は、従来の医薬上許容される担体、アジュバント及びビヒクルを含有する単位用量調製物において、経口的に、非経口的に、吸入スプレーにより、経直腸により、結節内に又は局所的に投与することができる。本明細書で使用用語「医薬上許容される担体」又は「生理学上許容される担体」は、医薬組成物として核酸、ポリペプチド又はペプチドの送達を達成又は増強するのに好適な1又は複数の調製物材料を意味する。「医薬組成物」は、治療有効量の核酸又はポリペプチドを含む組成物である。用語「有効量」及び「治療有効量」は、それぞれ所望の治療効果（例えば、T細胞機能を回復させる）を観察するために使用される結合剤、核酸などの量を意味する。

10

20

30

40

50

【0064】

少なくとも1以上の有効用量の本明細書に記載される1つ又は複数の結合剤（及び/又はその誘導体）を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物宿主において1つ又は複数の疾患状態（例えば、HIV又はがん）を治療する方法も提供される。一部の実施形態では、結合剤は、配列番号1～190及び/又は表1A及び1Bに示す1つ又は複数を含むモノクローナル抗体、或いはその断片又は誘導体である。例えば、ある好ましい実施形態において、結合剤、又は組合せ中の結合剤の少なくとも1つは、配列番号143及び155（例えば、抗体A35795のように）、配列番号166及び180（例えば抗体A35774のように）、配列番号176及び189（例えば抗体135C H1cL1bのように）、及び/又は配列番号176及び190（例えば抗体135C H1cL1cのように）、及び/又はその保存的又は非保存的置換変異体を含んでよい。好ましくは、そのような結合剤のCDR領域（すなわち配列番号1～138）は置換されていない。その1つ又は複数の結合剤は、約0.1～約50mg/kg、約1～約30mg/kg、又は約5～約30mg/kg（例えば、約0.1、0.2、0.25、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35又は40mg/kgのいずれか）の用量で投与することができる。個々の結合剤それぞれの量は同じであっても異なってもよい。ある実施形態では、1つ又は複数の結合剤は、約10mg/kgで1回又は複数回、哺乳動物に（例えば、皮内、静脈内、経口、経直腸で）投与することができる。複数回投与される場合、用量は各投与でほぼ同一の量又は異なる量の結合剤を含んでよい。投与は、同一又は異なる間隔を空けて時間的に分離してよい。例えば、投与は、約6、12、24、36、48、60、72、84又は96時間、1週間、2週間、3週間、1カ月間、2カ月間、3カ月間、4カ月間、5カ月間、6カ月間、7カ月間、8カ月間、9カ月間、10カ月間、11カ月間、12カ月間、1.5年間、2年間、3年間、4年間、5年間、或いはこれらの期間の任意のもの前、後及び/又は間の期間により、分離することができる。一部の実施形態では、結合剤は、例えば他の薬剤（例えば、抗感染剤及び/又は化学療法薬）と共に投与することができる。そのような他の薬剤は、結合剤とほぼ同時に、又は異なる時点及び/又は頻度で投与することができる。当業者が容易に特定できるように、そのような方法の他の実施形態も適切となり得る。

【0065】

本明細書に記載される結合剤（例えば抗体など）を使用する際に当業者を助けるために、それをキットの形態で提供してもよい。そのような結合剤（例えば抗体など）、及び任意選択的にその抗体を使用してPD-1を発現する細胞を検出するのに必要な他の成分を含むキットを提供する。キットの結合剤（例えば抗体など）は、冷凍、凍結乾燥などの任意の好適な形態で、或いはTBS又はPBSのような医薬上許容されるバッファー中に、提供してよい。キットは、例えば、バッファー（例えば、TBS、PBS）、ブロッキング剤（脱脂粉乳、正常血清、Tween-20界面活性剤、BSA、又はカゼインを含む溶液）、及び/又は検出試薬（例えば、ヤギ抗マウスIgGビオチン、ストレプトアビジン-HRPコンジュゲート、アロフィコシアニン、B-フィコエリトリン、R-フィコエリトリン、ペルオキシダーゼ、検出可能な標識及びその他の標識及び/又は染色キット（例えば、ABC染色キット、Pierce））などの、*in vitro*又は*in vivo*で抗体を利用するのに必要とされる他の試薬も含んでいてよい。キットは、例えばフローサイトメトリー解析、ELISA、免疫プロット（例えば、ウェスタンプロット）、*in situ*検出、免疫細胞化学、免疫組織化学などの、上述した一般的に利用されるアッセイにおいて抗体を使用するための他の試薬及び/又は取扱説明書も含んでいてよい。1つの実施形態では、キットは、精製形態で結合剤を提供する。また別の実施形態では、結合剤をビオチン化形態で、単独で又はアビジンコンジュゲート検出試薬（例えば、抗体）と共に、提供してよい。また別の実施形態では、キットは、PD-1を直接検出するのに使用できる1又は複数の検出可能な標識を有する結合剤を含む。これらの系のいずれかを使用するのに必要とされるバッファーなどは、当技術分野において周知であり、及び/又は最終使用者によって準備するか、又はキットの構成成分として提供してもよい。キットは、陽性対照及び陰性対照タンパク質及び/又は組織サンプルを含む、固体支持体も含んでいてよい。例えば、スポットティング又はウェスタンプロットタイプのアッセイを実施するためのキットは、SDS-PAGEで使用するための対照細胞又は組織溶解物、或いは、実験サンプルのための追加のスペースと共に事前に固定された対照サンプルを含有するナイロン膜又は他の膜も含んでいてよい。スライド上の細胞におけるPD-1を可視化するためのキットは、実験サンプルのための追加のスペースと共に対照細胞又は組織サンプルを含有するフォーマット済みスライドも含んでいてよい。当業者には理解されるように、キットの他の実施形態も本明細書において企図されている。

10

20

30

40

50

【0066】

そこで、本開示は、PD-1に作動的又は拮抗的に結合する結合剤を提供する。一部の実施形態では、結合剤は、配列番号1~190からなる群より選択される及び/又は表1A及び1Bに示される少なくとも1つのアミノ酸配列を含むポリペプチドである。一部の実施形態では、結合剤は、（例えば、表1A及び/又は1Bに示されるような）配列番号1~138及び/又は配列番号139~190の1又は複数の組合せを含むポリペプチドである。一部の実施形態では、結合剤は抗体である。一部の実施形態では、結合剤は、配列番号1~23からなる群より選択される重鎖CDR1アミノ酸配列を含む抗体などのポリペプチドである。一部の実施形態では、結合剤は、配列番号24~46からなる群より選択される重鎖CDR2アミノ酸配列を含む抗体などのポリペプチドである。一部の実施形態では、結合剤は、配列番号47~69からなる群より選択される重鎖CDR3アミノ酸配列を含む抗体などのポリペプチドである。一部の実施形態では、結合剤は、配列番号70~92からなる群より選択される軽鎖CDR1アミノ酸配列を含む抗体などのポリペプチドである。一部の実施形態では、結合剤は、配列番号93~115からなる群より選択される重鎖CDR2アミノ酸配列を含む抗体などのポリペプチドである。一部の実施形態では、結合剤は、配列番号116~138からなる群より選択される重鎖CDR3アミノ酸配列を含む抗体などのポリペプチドである。ある実施形態において、結合剤は、配列番号164~190の1つ又は複数、及び/又はその保存的又は非保存的置換誘導体を含む抗体などのポリペプチドである。ある実施形態において、結合剤は、配列番号139~150の内の1つ又は複数、及び配列番号151~163の内の1つ又は複数を含む抗体などのポリペプチドである。ある実施形態において、結合剤は、配列番号164~177

の内の1つ又は複数、及び配列番号178～190の内の1つ又は複数を含む抗体などのポリペプチドである。例えば、ある好ましい実施形態において、結合剤又は組合せ中の結合剤の少なくとも1つは、配列番号143及び155（例えば抗体A35795のように）、配列番号166及び180（例えば抗体A35774のように）、配列番号176及び189（例えば抗体135C H1cL1bのように）、及び/又は配列番号176及び190（例えば抗体135C H1cL1cのように）、及び/又はその保存的又は非保存的置換誘導体（例えば、表5～8に示すような）を含む抗体であってよい。ある実施形態では、結合剤は、表1A及び/又は1Bに示すCDRの組合せを含み、及び/又は表3及び/又は表11～13の任意の1つ又は複数に記載する特性を有する。

【0067】

一部の実施形態では、結合剤は、ヒト抗体、ヒトIgG、ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG2a、ヒトIgG2b、ヒトIgG3、ヒトIgG4、ヒトIgM、ヒトIgA、ヒトIgA1、ヒトIgA2、ヒトIgD、ヒトIgE、イヌ抗体、イヌIgGA、イヌIgGB、イヌIgGC、イヌIgGD、ニワトリ抗体、ニワトリIgA、ニワトリIgD、ニワトリIgE、ニワトリIgG、ニワトリIgM、ニワトリIgY、ヤギ抗体、ヤギIgG、マウス抗体、マウスIgG、ブタ抗体及び/又はラット抗体及び/又はそれらの誘導体由来する、又は（例えば、配列又は起源によって）それらに関連する。一部の実施形態では、誘導体は、例えば、Fab、Fab₂、Fab'一本鎖抗体、F_v、一本鎖（例えばscF_v）、V_{HH}/V_H、単一特異性抗体、二重特異性抗体、三重特異性抗体、多重特異性抗体、多価抗体、キメラ抗体、イヌ-ヒトキメラ抗体、イヌ-マウスキメラ抗体、イヌFcを含む抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、イヌ化抗体、CDRグラフト化抗体、サメ抗体、ナノボディ及び/又はラクダ抗体からなる群より選択することができる。そのような抗体、断片などは、そのための広く利用可能な技術の任意のものを用いて作製することができる。例えば、ヒト化抗体は、米国特許第9,090,994号明細書（Zhang et al.）に記載されている手順を用いて、及び/又は広く利用可能なキット及び/又はシステム（例えば、GenScript（登録商標）などの民間企業（例えば、FASBAシステム）から入手可能なものなど）を用いて作製することができる。ある実施形態において、結合剤は、配列番号139～190の（又はそのようなアミノ酸をコードする核酸配列によってコードされる）アミノ酸配列の1つ又は複数、及び/又はその誘導体又は変異体（例えば、その保存的置換誘導体又は変異体）を含むヒト化抗体であってよい。当業者に理解されるように他の実施形態も企図されている。

【0068】

ある実施形態において、結合剤は、配列番号139～150の内の少なくとも1つ、及び配列番号151～163の内の少なくとも1つ、及び/又はその誘導体又は変異体（例えば、その保存的置換誘導体又は変異体）を含むヒト化抗体であってよい。ある実施形態において、結合剤は、表12に示される、ヒト化抗体A35796（配列番号140及び152を含む）、ヒト化抗体A35793（配列番号141及び153を含む）、ヒト化抗体A35818（配列番号142及び154を含む）、ヒト化抗体A35795（配列番号143及び155を含む）、ヒト化抗体A35797（配列番号144及び156を含む）、ヒト化抗体A35799（配列番号145及び157を含む）、ヒト化抗体A35805（配列番号146及び158を含む）；ヒト化抗体137F V_H1/V_L1（配列番号147及び159を含む）、ヒト化抗体137F V_H2/V_L2（配列番号148及び160を含む）、ヒト化抗体137F V_H1b/V_L1b（配列番号149及び161を含む）、ヒト化抗体137F V_H1c/V_L1c（配列番号150及び162を含む）、又はヒト化抗体137F V_H1b/V_L1d（配列番号149及び163を含む）によって示される、ヒト及びサル（PD-1）に対する結合親和性（ k_a （ $M^{-1} s^{-1}$ ）、 k_d （ s^{-1} ）、及び KD （ M ））とほぼ同一の結合親和性（すなわち、その約250%、約200%、約150%、約100%、約75%、約50%、約25%、約20%、約15%、又は約10%のいずれかの範囲内にある；及び/又は最低でも10 nMの親和性（ $KD 10^{-8} M$ ））を示す。ある実施形態において、137F V_L1d

10

20

30

40

50

を任意の他の 137F 可変重鎖と組み合わせて（又は対にして）よい。

【0069】

他の実施形態において、結合剤は、配列番号 164 ~ 177 の内の少なくとも 1 つ、及び配列番号 178 ~ 190 の内の少なくとも 1 つ、及び / 又はその誘導体又は変異体（例えば、その保存的置換誘導体又は変異体）を含むヒト化抗体であってよい。ある実施形態では、結合剤は、表 13 に示される、ヒト化抗体 A35775（配列番号 164 及び 178 を含む）、ヒト化抗体 A35783（配列番号 165 及び 179 を含む）、ヒト化抗体 A35774（配列番号 166 及び 180 を含む）、ヒト化抗体 A36443（配列番号 167 及び 181 を含む）、ヒト化抗体 A35777（配列番号 168 及び 182 を含む）、ヒト化抗体 A35789（配列番号 169 及び 18 を含む）、ヒト化抗体 A36448（配列番号 170 及び 184 を含む）、又はヒト化抗体 A36437（配列番号 171 及び 185 を含む）；ヒト化抗体 135C VH1/VL1（配列番号 172 及び 186 を含む）、ヒト化抗体 135C VH2/VL2（配列番号 173 及び 187 を含む）、ヒト化抗体 135C VH3/VL3（配列番号 174 及び 188 を含む）、ヒト化抗体 135C VH1b/VL1b（配列番号 175 及び 189 を含む）、ヒト化抗体 135C VH1c/VL1b（配列番号 176 及び 189 を含む）、ヒト化抗体 135C VH1c/VL1c（配列番号 176 及び 190 を含む）、又はヒト化抗体 135C VH1d/VL1c（配列番号 177 及び 190 を含む）のヒト及びサル PD-1 に対する結合親和性（ k_a (M^{-1}/s^{-1})、 k_d (s^{-1})、及び K_D (M)) とほぼ同一の結合親和性（すなわち、それらの約 25%、約 20%、約 15%、又は約 10% のいずれかの範囲内にある；及び / 又は最低でも 10 nM の親和性 (K_D 10^{-8} M)) を示す。

10

20

【0070】

一部の実施形態では、結合剤は少なくとも第 1 及び第 2 の特異性を有し、第 1 の特異性は PD-1 に対するものであり、第 2 の特異性は異なる抗原（例えば、HIV などの感染性因子の抗原（例えば En v）及び / 又は腫瘍抗原）に対するものである。一部の実施形態では、結合剤及び / 又はその誘導体は、それに固定可能に付着させた検出可能な標識を含んでいてよい。一部の実施形態では、結合剤及び / 又はその誘導体は、それに固定可能に付着させたエフェクター部分（例えば、細胞毒性薬、毒素、ジフテリア A 鎖、外毒素 A 鎖、リシン A 鎖、アブリン A 鎖、クルシン、クロチン、フェノマイシン、エノマイシン及び放射化学薬品）を含む。一部の実施形態では、1 つ又は複数の結合剤をコードするポリヌクレオチド（例えば、発現ベクターとして）も提供する。そのようなポリヌクレオチドのポリペプチド産物を含む及び / 又は発現する宿主細胞も提供する。一部の実施形態では、少なくとも 1 つの結合剤又は誘導体；少なくとも 1 つの単離ポリヌクレオチド；少なくとも 1 つの発現ベクター；及び / 又は少なくとも 1 つの宿主細胞；又はそれらの組合せ；並びに医薬上許容される担体を含む組成物も提供する。

30

【0071】

本開示はさらに、細胞上の PD-1 を検出する方法であって、試験生物学的サンプルを本明細書に記載される結合剤又は誘導体と接触させる工程、及びその生物学的サンプル又はその成分に結合した結合剤を検出する工程を有してなる方法も提供する。そのような方法は、*in vivo* 法又は *in vitro* 法であってよい。一部の実施形態では、その方法は、試験生物学的サンプル又はその成分に結合した量を対照生物学的サンプル又はその成分に結合した量と比較する工程を含み、対照生物学的サンプル又はその成分に結合した量と比較した、試験生物学的サンプル又はその成分に結合した量の増加は、試験生物学的サンプル（例えば、哺乳動物血液）における PD-1 を発現する細胞の存在を示す。一部の実施形態では、機能的疲弊回復アッセイ (EFRA) により候補結合剤をアッセイし；PD-1 に対する候補結合剤の親和性を特定し；さらに候補結合剤の CDR のヌクレオチド配列を特定することにより、PD-1 抗体結合剤を同定するためのシステムを提供する。

40

【0072】

一部の実施形態では、細胞内又は細胞上での PD-1 の発現を検出するためのキットで

50

あって、結合剤又はその誘導体、及び使用説明書を含むキットを提供する。一部の実施形態では、結合剤及び/又はその誘導体は凍結乾燥形態にある。

【0073】

一部の実施形態では、本開示は、哺乳動物において、感染性疾患、がん及び/又は自己免疫を治療、予防及び/又は改善する方法であって、結合剤又はその誘導体を含む医薬組成物の少なくとも1有効用量を哺乳動物に投与することを含む方法を提供する。一部の実施形態では、感染性疾患は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)である。一部の実施形態では、感染性疾患及び/又はがんを治療するために使用される結合剤及び/又はその誘導体は、PD-1アンタゴニストである。一部の実施形態では、自己免疫状態を治療するために使用される結合剤及び/又はその誘導体は、PD-1アゴニストである。一部の実施形態では、複数用量が動物に投与される。一部の実施形態では、結合剤及び/又はその誘導体は、約0.1~約50mg/kg、約1~約30mg/kg、又は約5~約30mg/kg(例えば、約0.1、約0.2、約0.25、約0.3、約0.4、約0.5、約0.6、約0.7、約0.8、約0.9、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、約35、又は約40mg/kgのいずれか)の投与量で投与することができる。

10

【0074】

本開示は、さらにPD-1結合剤の組合せも提供する。一部の実施形態では、組合せは、PD-1とPD-L1との相互作用をブロックする第1結合剤、及びPD-1とPD-L1との相互作用をブロックしない第2結合剤を含む。例示的な組合せとして、例えば、ブロッキング抗PD-1抗体の1つ又は複数と、例えば、135C12(配列番号17、40、63、86、109、及び132)、139D6(配列番号2、25、48、71、94、及び117)、135D1(配列番号3、26、49、72、95、及び118)、及び/又は136B4(配列番号19、42、65、88、111、及び134)のアミノ酸配列を含むものの任意の1つ又は複数のような、この中に記載されている非ブロッキング結合剤の1つ又は複数と、を含んでよい。例示的な実施形態は、ブロッキング抗体MK3475(ペムプロリズマブ)、又は配列番号8、31、54、77、100、及び123(137F2)のアミノ酸配列を含むブロッキング結合剤と、配列番号17、40、63、86、109、及び132(135C12)のアミノ酸配列を含む非ブロッキングPD-1結合剤との組合せを含む。図9A及びBに示すように、これらの例示的な組合せの両方が、いずれか一方の抗体単独で達成されるよりもさらに、HIV-特異的CD8⁺T細胞の機能的疲弊の救済を増強し及びその増殖を高める。ブロッキング抗体MK3475又は137F2と組み合わせると有用となりうる他の例示的な非ブロッキング抗体は、非ブロッキングP2パッチ特異的(M4(図3A、B))結合剤135D1(配列番号3、26、49、72、95、及び118を含む)、及び/又は結合剤139D6(配列番号2、25、48、71、94、及び117を含む)、及び/又は非ブロッキングP2パッチ特異的(M17(図3A、E))結合剤136B4(配列番号19、42、65、88、111、及び134を含む)である。他の組合せも当業者に特定されるように適切となりうる。

20

30

40

【0075】

そのような組合せを、本明細書に記載される又は当業者が確認できる任意の用途のために使用できる。例えば、そのような組合せを、本明細書に記載される哺乳動物における感染性疾患、がん及び/又は自己免疫を治療、予防及び/又は改善する方法において使用してよい。ある実施形態では、対象において炎症を治療する方法であって、少なくとも2つのアンタゴニストPD-1結合剤の組合せを投与することを含み、前記結合剤のそれぞれがPD-1上の異なるエピトープに対する特異性を有し、前記結合剤の少なくとも1つはPD-1とPD-L1との相互作用にブロッキング性であり、及び前記結合剤の少なくとも1つはPD-1とPD-L1との相互作用に非ブロッキング性である方法も提供する。

50

本開示はまた、対象において慢性神経変性状態を治療する方法であって、少なくとも2つのアンタゴニストPD-1結合剤の組合せを投与することを含み、前記結合剤のそれぞれがPD-1上の異なるエピトープに対する特異性を有し、前記結合剤の少なくとも1つはPD-1とPD-L1との相互作用にブロッキング性であり、及び前記結合剤の少なくとも1つはPD-1とPD-L1との相互作用に非ブロッキング性である方法も提供する。ある実施形態において、慢性神経変性状態はアルツハイマー病である。本開示はまた、例えばがんの治療におけるような、*in vivo*で、例えばヒト腫瘍細胞などの腫瘍細胞の増殖を阻害する方法であって、少なくとも2つのアンタゴニストPD-1結合剤の組合せを投与することを含み、前記結合剤のそれぞれがPD-1上の異なるエピトープに対する特異性を有し、前記結合剤の少なくとも第1結合剤がPD-1とPD-L1との相互作用にブロッキング性であり、及び前記結合剤の少なくとも第2結合剤がPD-1とPD-L1との相互作用に非ブロッキング性である方法も提供する。ある実施形態において、前記組合せは、例えば、RASKGVSTSGYSYLH（配列番号287）、LASYLES（配列番号288）、QHSRDLPALT（配列番号289）、NYMY（配列番号290）、GINPSNGGTNFNEKFKN（配列番号291）、及び/又はRDYRFDMGFY（配列番号292）の内の少なくとも1つを含む抗体；MK3475；及び/又はキイトルーダなどの、ブロッキング結合剤を含んでいてよい。ある実施形態において、例えば抗体などの非ブロッキング結合剤は、配列番号17、40、63、86、109及び132の内の少なくとも1つ、又は配列番号164～190の内の任意の1つ又は複数（例えば配列番号176及び190）、及び/又は少なくとも1つのアミノ酸置換を有するその誘導体を含んでいてよい。ある実施形態において、哺乳動物に複数回投与され、それらの投与は、約1週間、約2週間、約3週間、或いは望ましくは約1ヶ月又はそれ以上の間隔をあけて行ってよい。

【0076】

本開示は、細胞において結合剤を発現させ、さらにその細胞又はその細胞の培養上清から結合剤を単離することにより、本明細書に記載される結合剤を製造する方法も提供する。一部の実施形態では、その方法は、そのような結合剤をコードする核酸を発現させる工程をさらに含んでいてよい。一部の実施形態では、そのような方法は、単離後に結合剤を1又は複数の医薬上許容される賦形剤と組み合わせる工程をさらに含んでいてよい。

【0077】

本開示によって、例えばPD-1とPD-L1との相互作用をブロックする第1結合剤、及びPD-1とPD-L1との相互作用をブロックしない第2結合剤などの、結合剤の組合せを製造する方法も提供される。一部の実施形態では、第2結合剤はPD-1に結合する。一部の実施形態では、第1及び/又は第2結合剤は、例えばモノクローナル抗体、或いはその断片又は誘導体のような抗体である。一部の実施形態では、第2結合剤は、配列番号17、40、63、86、109、及び132（例えば135C12）；配列番号2、25、48、71、94及び117（例えば139D6）；配列番号3、26、49、72、95、及び118（例えば135D1）；及び/又は配列番号19、42、65、88、111、及び134（例えば136B4）のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、これらの方法は、医薬上許容される賦形剤の添加をさらに含んでいてよい。

【0078】

用語「約」、「ほぼ」などは、数値又は範囲のリストに先行する場合は、リスト又は範囲内の各個別値の直前にその用語が置かれているかのように、そのリスト又は範囲内の各個別値に独立して言及する。これらの用語は、それが言及する数値がその数値と正確に同一、それに近い、又はそれに類似することを意味する。

【0079】

本明細書で使用する「対象」又は「宿主」は、個体であることが意味される。対象は、例えばネコ及びイヌ、家畜類（例えば、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ及びヤギ）などの家畜化された動物、実験動物（例えば、マウス、ウサギ、ラット、モルモット）及びトリ類を含んでいてよい。1つの態様では、対象は、例えば霊長類又はヒトなどの哺乳動物である

。

【 0 0 8 0 】

「任意選択的」又は「任意選択的に」は、続いて記載した事象又は状況が発生しても発生しなくてもよく、その記述が事象又は状況が発生する場合及びそれが発生しない場合を含むことを意味する。例えば、語句の「任意選択的に組成物が組合せを含み得る」は、その記述が組合せと組合せの非存在（すなわち、組合せの個々のメンバー）の両方を含むように、その組成物が、異なる分子の組合せを含んでも又は組合せを含まなくてもよいことを意味する。

【 0 0 8 1 】

本明細書では、「範囲」は、約1つの特定値から、及び/又は約別の特定値までとして表示することができる。そのような範囲が表示される場合、別の態様は、その一方の特定値から、及び/又はその他方の特定値までを含む。同様に、数値が近似値として表示される場合は、先行詞「約」又は「ほぼ」の使用によって、その特定値が別の態様を形成すると理解されるであろう。さらに、範囲のそれぞれの終点は、他の終点に関連して、及び他の終点から独立しての両方で有意であることが理解されるであろう。範囲（例えば、90～100%）は、各数値が個別に列挙されているかのように範囲自体、並びにその範囲内の各独立値を含むことが意図されている。

10

【 0 0 8 2 】

用語「組み合わせる(combined)」、「組み合わせて(in combination)」又は「共に(in conjunction)」は、一緒に投与される薬剤の物理的組合せ、或いは、特定疾患を治療、予防及び/又は改善するための治療計画における2つ以上の薬剤の使用（例えば、物理的及び/又は時間において別個に投与される）を意味することができる。

20

【 0 0 8 3 】

「治療する」、「予防する」及び/又は「改善する」の用語が、所定の状態のための所定の治療（例えば、がん又はHIVによる感染を予防する）と関連して使用される場合、治療された患者が臨床的に観察可能なレベルのその状態を全く発生しない、又は彼/彼女が治療を受けなかった場合よりも、ゆっくり及び/又は少ない程度までしかその症状を発生しないことを伝えることが意図されている。これらの用語は、患者が全くその状態の態様を経験しない状況のみに限定されるものではない。例えば、「治療」は、状態の所定の発現を生じると予測される刺激物への患者の曝露中に与えられ、それが与えられなかった場合に予測されるよりも少ない及び/又はより軽度の症状をその患者が経験する場合に、その状態を予防したと言われるであろう。例えば、治療は、患者が感染の軽度の明らかな症状しか示さない状態をもたらすことによって、感染を「予防する」ことができる；これは、感染微生物による細胞の侵入があってはならないことを意味するものではない。

30

【 0 0 8 4 】

同様に、特定の治療による所定の状態の予防、治療及び/又は改善と関連して本明細書に使用される「低減させる」、「低減させること」及び/又は「低減」は、典型的には、治療（例えば、1つ又は複数のPD-1結合剤の投与）の非存在下において感染症を発生する対照又は基底レベルと比較して、よりゆっくり、又はより少ない程度に感染症を対象が発生することを意味する。感染症のリスクの低減は、患者が、感染の軽度の明らかな症状又は感染の遅延された症状のみを示すことを生じさせ得る；これは、感染微生物による細胞の侵入があってはならないことを意味するものではない。

40

【 0 0 8 5 】

本開示の中で言及したすべての参考文献は、その全体が参照によりここに組み込まれる。下記の実施例では、所定の実施形態についてさらに記載する。これらの実施形態は、例示としてのみ提供され、決して特許請求項の範囲を限定することを意図していない。

【実施例】

【 0 0 8 6 】

実施例 1

PD-1結合剤の作製及び特性解析

50

4種のマウス系統(マウス計16匹)を、2種のPD-1タンパク質、すなわちヒトPD-1Fc融合タンパク質及びヒトPD-1モノマータンパク質で免疫した。活性化ヒトTリンパ球上に発現されたPD-1に対して血清反応性を示すマウスを、抗PD-1ハイブリドーマ細胞株を作製するために選択した。組換えPD-1タンパク質に結合する抗体を作製するために、計240のPD-1ハイブリドーマ細胞株を選択した。第1ラウンドの抗体選択のための一次基準は：i)フローサイトメリーによる活性化ヒトTリンパ球上のPD-1の染色；ii)既存の抗PD-1抗体と比較したCDR-VH及びVL配列の多様性；及び(iii)PD-1上の異なるエピトープに結合する2つの市販の抗PD-1抗体と共にPD-1コンジュゲートLuminoxビーズを用いる競合結合試験によって実施されるエピトープマッピングであった。次に、第2ラウンドの選択を：iv)親和性結合アッセイ(抗PD-1抗体の刺激能力とは相関しないので一次基準ではない)；v)PD-1に結合し、かつLuminox生化学的アッセイにおいてPD-L1の結合にブロッキング性又は非ブロッキング性のいずれかである抗PD-1抗体の評価；及びvi)アゴニスト(T細胞を機能的疲弊から回復させることができない)又はアンタゴニスト(T細胞を機能的疲弊から回復させることができる)としての抗体の機能的特性解析；によって実施した。これらの試験では、抗体を試験して、HIV特異的疲弊CD8⁺T細胞において増殖を救済する能力に基づき差別化した。

10

【0087】

個々の細胞培養ハイブリドーマ細胞クローンからの抗体上清の一次スクリーニングにおいて、HIV特異的CD8⁺T細胞の増殖に対する抗PD-1抗体の機能的効果を評価するためにEFRAアッセイを実施した。抗体クローンE8-3、C2-3、E1-3、F3-3、H8-3、C10-2、G2-1、G3-2、H2-1及びH4-2は、PD-1アンタゴニストとして作用して増殖を刺激することが見いだされたが、抗体クローンC8-1及びG10-2は、作動性(アゴニスト)で、PD-1の負の調節作用を促進する。ペプチド対照(Pep8)によって誘導された増殖のレベルは、1%よりわずかに下であり、MerckMK-3475抗PD1抗体により誘導された増殖は2%よりわずかに上である。これらのプロセスによって同定された関心抗体は、第2ラウンドのサブクローニングを受け、その結果得られたハイブリドーマクローンを、表3に示す抗体の産生及び精製のために使用した。サブクローニングがPD-1に対する親和性を保持していることを確認するために、精製抗PD-1を用いて結合アッセイを実施した。抗PD-1抗体の細胞表面PD-1への濃度反応結合を、活性化CD4⁺T細胞上で評価した。

20

30

【0088】

EFRAは、機能的疲弊からT細胞を回復させる結合剤の選択を提供するが、その選択はPD-1とその生物学的リガンド(例えば、PD-L1又はPD-L2)との相互作用を妨害しない結合剤に必ずしも限定されない。EFRAの実施形態は、PD-1に結合するそのような結合剤(抗体)を同定するためであった。PD-1に結合する抗体のエピトープマッピングを、2つの別個の生化学的アッセイを用いて実施した。1つのアッセイでは、PD-1Fc融合タンパク質標識ビーズに対する競合結合を、2種の市販の抗PD-1抗体(クローンEH12.2H7及びJ116)の内の1つと、列挙した(表3にも記載した)抗PD-1抗体との間で評価した。別個のエピトープに結合する4つのクラス(表3にも記載した)のモノクローナル抗体をこのアッセイに基づき同定した。それらは：クラス1(PD-1とPD-L1との相互作用をブロックする市販モノクローナル抗体クローンEH12.2H7と競合的)、クラス2(PD-1に結合するがPD-1とPD-L1との相互作用を有効にはブロックしない市販モノクローナル抗体クローンJ116と競合的)、クラス3(市販モノクローナル抗体EH12.2H7及びJ116の両方と競合的)及びクラス4(市販抗体EH12.2H7及びJ116のどちらとも非競合的)である。抗体を4つの結合クラスの内1つに入れ、細胞表面PD-1に対するこれら抗体の相対的結合を、対照抗PD-1抗体に対する平均蛍光強度(MFI)によって表わした。これらの結果は、堅固な結合抗体が4つ全ての結合クラスから同定されたことを示した。第2のLuminox結合アッセイを使用して、抗PD-1抗体が、PD-1とPD-L1との間の相互作

40

50

用をブロックするか否かを直接的に評価した。このアッセイは、PD-1 Fc融合タンパク質被覆ビーズを用いて実施し、PD-1 Fc融合タンパク質被覆ビーズを表3からの抗PD-1抗体と共にインキュベートし、その後PD-1/抗体複合体を様々な濃度のビオチン化PD-L1とインキュベーションした。結合曲線を、競合抗PD-1抗体の非存在下でのPD-L1の結合と比較した。表3からのある抗PD-1抗体(図1Aに示されている抗体137F2)は、PD-1とPD-L1との間の相互作用を完全にブロックできることが分かった。PD-1/PD-L1相互作用の非ブロッキング抗体として表3に列挙した抗体は、PD-1に対するPD-L1の結合親和性のシフトをもたらすが、PD-L1の濃度が上昇した場合に相互作用をブロックしない(図1B及びCにそれぞれ示されている抗体135C12及び136B4)。1つの解釈において、これらの抗体はPD-1/PD-L1相互作用と非競合的であるか或いは部分的に競合的であるかのいずれかである。これら抗体の一部は、対照と比較して増殖の統計的に有意な増加をもたらすことも示された。クラス1の抗体(PD-1とPD-L1との相互作用をブロックする市販モノクローナル抗体EH12.2H7と競合的、又はPD-1/PD-L1相互作用アッセイにおいてブロックする)は、概して、改善された増殖回復をもたらすことが特定された。複数回のEFRA実験からのデータを組み合わせ、及び共通コンプレーターとしてのMK-3475を使用して、表2に記載した選択抗体は、ベンチマークMK-3475抗体と比較して、同等又は統計的に改善された活性($p < 0.007$)を示した。

10

【0089】

実施例2

抗体の組合せ

異なるPD-1エピトープに結合する抗体の組合せが、機能的疲弊回復アッセイにおいて、HIVペプチド特異的CD8 T細胞増殖の回復を増強することが見いだされた。抗体タイプ間の相乗作用も観察された。例えば、クラス1(MK-3475)及びクラス2(139D6)の抗体が同時にPD-1に結合できることが特定された。MK-3475について観察された最高の刺激は、HIVペプチドに対して一貫して約200%であるが、各5 μ g/mlでのMK-3475及び139D6モノクローナル抗体の組合せは、HIVペプチド対照単独に対して288%にHIV特異的CD8 T細胞増殖を増加させ、又はMK-3475又は139D6添加単独に対して144%に増殖を増加させ、相乗作用を示した。増殖におけるこの相乗的増加は、数回の実験による試験において0.007の統計的有意なp値をもって観察された。比較として、MK-3475又は139D6いずれか単独の10 μ g/mlの添加は、EFRAにおける増殖増加を生じさせなかった。従って、PD-1とPD-L1との相互作用をブロックする第1結合剤及びPD-1とPD-L1との相互作用をブロックしない第2結合剤のような、結合剤の組合せは、T細胞を疲弊から救済するために相乗的に作用すると特定された。

20

30

【0090】

実施例3

抗PD-1抗体のエピトープマッピング

予備的エピトープマッピング評価は、市販の抗PD-1抗体(EH12.2H3及びJ116)と、この特許で規定される新たに同定された抗PD-1抗体との間での生化学的競合結合アッセイ試験に基づくものであった。この手順は、上記の2つの市販の抗体のいずれかと競合的に又は非競合的にPD-1に結合することに基づき、抗体を4つの結合クラスの内1つに分類することを可能にした。PD-1上のエピトープに結合する抗体を特定するより正確な方法は、溶媒露出残基での慎重なアミノ酸置換を有する異なるPD-1タンパク質との抗体の相互作用をモニターすることである。これらの残基が抗PD-1抗体の堅固な結合に重要である場合、置換はPD-1タンパク質への結合を低減させる。これらの試験は、CMVプロモータの制御下において哺乳動物発現ベクターpReceiver-M67内にコードされたPD-1遺伝子の部位特異的突然変異誘発により行われた。PD-1タンパク質のための公開された構造データ3RRQ PDBを用いて、溶媒露出残基に1つ、2つ又は3つのアミノ酸置換を有する31の異なるPD-1クローンを

40

50

設計した。PD-1とPD-L1/L2との間の相互作用に關与する残基を、ヒトPD-1とPD-L2との複合体の公開結晶構造に基づき特定し(Lazar-Molnar、PNAS、2008、p10483-10488)、さらに図2に示すPD-1構造に番号を記載した球体としてマッピングした(番号付けはヒトPD-1(図2H、配列番号275)のアミノ酸残基に対応する)。置換は、PD-1/PD-L1相互作用に關係する残基(M10、M11、M12、M14、M23、M24、M25で表される)において、或いはPD-L1相互作用に直接は關係しないPD-1タンパク質の反対側の又は隣接する表面にある残基(M1、M2、M3、M4、M5、M6、M7、M8、M9、M13、M15、M16、M17、M18、M19、M20、M21、M22、M26、M27、M28、M29、M30、M31で表される)において選択され、図3で規定されている。次に、PD-1をコードするDNAベクターを用い、Lipofectamine 2000トランスフェクション試薬を用いてHeLa細胞を一過性トランスフェクトした。細胞を37℃で36~48時間、採用培養インキュベータ中でインキュベートして、PD-1タンパク質を細胞表面発現させ、次いで細胞を再懸濁させ、0.3~2µg/mlの間の表3から選択される所定の抗PD-1抗体と共に30分間インキュベートした。洗浄工程の後、細胞をPE標識抗マウスIgG二次抗体で染色し、その後フローサイトメトリーで解析した。各実験において、野生型PD-1タンパク質を抗体結合の陽性対照として用い、さらにPD-1上の異なるエピトープに結合するいくつかの抗体(PD-1/PD-L1相互作用にブロッキング性であるか又は非ブロッキング性であるかによって、或いは市販のPD-1クローンを用いた競合結合試験から特定された)を並行して評価して異なるアミノ酸置換を有するPD-1タンパク質の相対的発現レベルをモニターした。表3からの試験した全ての抗PD-1抗体が、野生型PD-1でトランスフェクトしたHeLa細胞に特異的に結合したが、空のベクター対照でトランスフェクトした細胞には結合しなかった。PD-1/PD-L1相互作用にブロッキング性であるか又は非ブロッキング性である抗PD-1抗体を用いて染色したときに、全ての突然変異PD-1タンパク質が、野生型に近いレベルで発現したが、或いは非トランスフェクト対照と比較して平均蛍光強度において有意なシフトをもたらした。次に、表3からの抗体の選択セットを、トランスフェクトしたHeLa細胞の細胞表面で発現される野生型又は突然変異体のPD-1タンパク質のいずれかに結合する能力に関して体系的に試験した。これらの結果を、様々な抗PD-1抗体クローンのそれぞれに関して結合を失効させる又は低減させる突然変異を表示して、表11に要約する。図4~8に表すフローサイトメトリーヒストグラムは、指示された突然変異PD-1構築物でトランスフェクトしたHeLa細胞に効率的に又は低減された親和性で結合する様々な抗体の例を提供する。予測されるように、生化学的アッセイでPD-1/PD-L1相互作用にブロッキング性であることが示された抗体(MK-3475、137F2、140G5、及び139F11)は、その相互作用部位とオーバーラップするPD-1上のエピトープに結合した。生化学的PD-1/PD-L1相互作用試験と一致して、PD-1/PD-L1相互作用に非ブロッキング性である抗体(136B4、135C12、136E10)は、PD-1/PD-L1相互作用に關係するアミノ酸残基から遠位の別個のエピトープに結合した。図8において、136B4及び122F10抗体に関して、M17 PD-1タンパク質への結合に有意なシフトが観察されたが、135C12抗体に関してはM26 PD-1タンパク質に対して結合のわずかなシフトが観察された。これらの違いは、136B4と135C12が、別個のファミリーに屬するCDRループを有し、図13に表すように両方がP2パッチとオーバーラップするPD-1上の異なるエピトープに結合することをはっきり示す。

【0091】

10

20

30

40

【表 1 1】

表11

PD-1/PD-L1 相互作用にブロッキング性又は非ブロッキング性である様々な抗 PD-1 抗体クローンのエピトープマッピング

クローン	親和性* (nM)	結合 クラス**	PD-1/PD-L1 相互作用との 抗体競合***	EFRA ペプチド単独に対する パーセンテージ(%)	親和性低減を誘発 する PD-1 突然変異
137F2	1.5	1	ブロッキング	250%	M23
139F11	3.1	1	ブロッキング	250%	M23
140G5	1.6	1	ブロッキング	205%	M15
135C12	1.7	2	非ブロッキング	195%	M4, M17 [§] , M18 [§] , M26 [§] , M28 [§] , M31 [§]
139D6	2.4	2	非ブロッキング	195%	M4
135D1	6.5	2	非ブロッキング	187%	M4
136B4	1.4	2	非ブロッキング	185%	M17, M18
140A1	1.4	3	ブロッキング	160%	M13
122F10	2.2	4	非ブロッキング	146%	M17
134D2	4.8	4	ブロッキング	205%	M13, M15, M17 [§]
136E10	7.1	4	非ブロッキング	148%	M1
MK3575	0.6	1	ブロッキング	198%	M13, M14

* 表 1 に列挙した抗体の結合親和性は、活性化 CD4 T 細胞上の内因性細胞表面 PD-1 の FACS 染色により評価した。

** 結合クラスは、Luminex アッセイ競合結合試験によって決定した。結合クラス 1 の mAb クローンは EH12.2H7 クローン市販抗体と競合的であり、クラス 2 の mAb クローンは J116 クローン市販抗体と競合的であり、クラス 3 の mAb クローンは EH12.2H7 抗体及び J116 抗体の両方と競合的であり、クラス 4 の mAb クローンは EH12.2H7 抗体及び J116 抗体の両方の存在下で結合する。

*** PD-1/PD-L1 相互作用との抗体競合は、第 2 の Luminex 結合アッセイにおいて決定した。このアッセイでは、PD-1 Fc 融合タンパク質被覆ビーズを、濃度 20nM の表 11 からの抗 PD-1 抗体の非存在下又は存在下でインキュベートした。次に PD-1 /PD-L1 相互作用の IC₅₀ とほぼ同等である固定濃度の 1.25nM のビオチン化 PD-L1 を PD-1/抗体複合体とインキュベートし、フィコエリトリン標識ストレプトアビジンを使用して蛍光により PD-L1 結合を検出した。PD-1/抗体複合体への PD-L1 の結合に基づいて、抗体を、PD-1/PD-L1 相互作用にブロッキング性又は非ブロッキング性と定義した。

† 増殖作用は、CFSE アッセイ(機能的疲弊回復アッセイ「EFRA」の1つの実施形態)を使用して評価する。慢性 HIV 感染した対象から単離した PBMC を、抗 PD-1 抗体の存在下及び非存在下で HIV 特異的ペプチドにより刺激した。6 日間のインキュベーション後、ペプチド単独対照と比較した HIV 特異的 CD8 T 細胞の増殖を抗 PD-1 処理サンプルにおいて評価した。

§ アミノ酸置換をコードする突然変異 PD-1 に結合する抗体における小さなシフト

NA=利用不可(not available)

【0092】

実施例 4

PD-1 の新規なアンタゴニスト作用に関係する非ブロッキング抗体エピトープ多様な PD-1 上のエピトープに結合する抗体を、機能的疲弊回復アッセイにおいてそのアンタゴニスト活性について評価した。これらの試験は、アンタゴニスト抗体が、PD-1 / PD-L1 相互作用にブロッキング性又は非ブロッキング性のいずれかとなりうることを示した。抗 PD-1 抗体の機能活性に起因する作用形態が PD-1 の遮断(ブロック)によるものであることを考慮すれば、これらの結果は、非ブロッキングアンタゴニスト抗体によって阻害されている PD-1 の新規な機能を暗示する。この主張は、ブロッキング抗 PD-1 抗体と非ブロッキング抗 PD-1 抗体との組み合わせが、in vitro 機能的疲弊回復アッセイにおいてアンタゴニスト活性を増強させたことにより支持される。この増強された機能活性は、単独で投与した場合にいずれか一方の抗体で達成される誘導レベルを超えるものであり、ブロッキング(すなわち、競合的)抗 PD-1 抗体(MK3475 又は 137F2)の、非ブロッキング(すなわち、生化学的 PD-1 /

PD-1相互作用アッセイにおいて非競合的又は部分的に競合的である)抗PD-1抗体135C12(図9A)又は139D6(図9B)との様々な組合せを用いて実証された。それらの機能活性の更なる証拠として、混合リンパ球反応アッセイ(MLR)において、抗PD-1抗体を、単独で、或いはPD-1/PD-L1ブロッキング及び非ブロッキングアンタゴニスト抗体を組み合わせで試験した。MLRアッセイは、1人の健康ドナー由来の単球を、第2の健康ドナー由来のPD-1⁺メモリーCD4⁺T細胞と混合することを含む。磁気ビーズを用いたCD14ポジティブセレクションにより末梢血単核細胞(PBMC)から単球を単離した。第2のドナー由来のPBMCは、まず磁気ビーズを用いてCD45RA発現細胞を枯渇させ、次にCD4陽性T細胞のポジティブセレクションのために異なる磁気ビーズセットを用いた。次に、生存PD-1⁺細胞集団に基づきソートするために、これらのメモリーCD4⁺T細胞(CD4⁺CD45RA⁻)を、Aqualive/Dead染色キット、並びに127C2抗PD-1抗体クローン(アンタゴニスト活性を有しておらず、かつPD-1への結合に関してMK3475、137F2又は135C12と競合しないことが示されている)及び二次抗マウスPE抗体を用いて染色した。2人の異なるドナー由来の単球とCD4⁺T細胞を、1:2又は1:5の比率で混合した後、細胞を未処理のままにするか、或いは1µg/mlの図10に示される抗PD-1抗体で処理した。細胞培養インキュベータ中での5日間のインキュベート後、細胞培養上清の一部を採取し、ELISAで分泌IFNを分析した。細胞培養液にトリチウム標識チミジン(³H-TdR)を添加し、細胞をさらに18時間インキュベートした。³H-TdR取込みを細胞増殖の指標として用いた。この第2の独立した*in vitro*アッセイは、我々の抗PD-1抗体の機能活性を確認した。図10aにおいて、CD4⁺T細胞の2倍まで高められた増殖が、抗PD-1抗体の個々又は組合せにより誘導された。図10bにおいて、個々で試験したときに全ての抗PD-1抗体についてIFN産生の強い増加が観察され、137F2が最も高い誘導レベルをもたらした。ブロッキング抗PD-1抗体と非ブロッキング抗PD-1抗体の組合せ(MK3475及び135C12、又は137F2及び135C12のいずれか)において、PD-1⁺メモリーCD4⁺T細胞の増殖の増加及びIFN産生の増加の傾向が観察された。CD4⁺T細胞からのIFN産生の増加が、PD-1免疫チェックポイント遮断療法で治療した際のアルツハイマー病のマウスモデルにおける病状の軽減及び記憶の改善に関連する(Baruch K, Nature Med, 2015)ことを考えれば、この中に概要を説明した抗PD-1抗体又は抗PD-1抗体の組合せでの治療は、同等の又は向上した治療的利益を有することが予測される。下記にて説明するように、エピトープマッピングは、最も高い能力を有する非ブロッキング抗体は全て、PD-1の類似のバッチ(この中で「P2バッチ」と称される)に結合することを示し、そのP2バッチは、M4アミノ酸置換(セリン38をアラニンへ、プロリン39をアラニンへ、及びロイシン41をアラニンへ)(図3;配列番号142)の領域、及び/又はM17アミノ酸置換(アスパラギン102をアラニンへ及びアルギニン104をロイシンへ)(図3;配列番号155)の領域、及び/又はM18アミノ酸置換(アスパラギン酸塩105をアラニンへ)(図3;配列番号156)の領域、及び/又はM31アミノ酸置換(ロイシン41をアラニンへ及びバリン43をロイシンへ)(図3;配列番号206)の領域と、オーバーラップする。

【0093】

抗PD-1抗体のアンタゴニスト活性に関係するPD-1の領域をさらに調べるために、異なる種からの溶媒露出変異アミノ酸残基をヒトPD-1構造にマッピングした。3RRQ PDBに基づくこの構造表示は、図11aにおいてPD-L1/L2と相互作用するPD-1の面を、また図11bにおいてPD-1の反対側を示す。サルとヒトのPD-1間で異なる残基を赤の円で示し、齧歯類(マウス及びラット)のPD-1で見られる他の変異残基を緑の円で表し、イヌのPD-1からの追加の変異残基をオレンジで示す。残基46、58、74及び116は、N-結合型グリコシル化の部位に関係があるとされ、青緑色の円で印している。ヒト、サル、ウマ、イヌ、マウス及びラットのPD-1エクトドメインアミノ酸配列の整列を図11cに示し、ヒトPD-1との対応する相同性はそれ

10

20

30

40

50

ぞれ、96.6%、79.9%、73.2%、62.4%及び66.4%である。PD-1のこれらの異種間の変異残基を構造上に示すことにより、図11a及び11bにおいてP1及びP2として指定されるPD-1上の2つの保存されたパッチがあることが明らかとなる。P1パッチは、PD-1とPD-L1/PD-L2リガンドとの間の相互作用に関連する中心領域に該当する(図2において球で印す残基を、図11aのものと比較する)。進化中にPD-1に蓄積する変異残基はPD-L1/L2リガンドとの相互作用をなお維持する必要があるため、このP1パッチの異種間の保存が予想される。PD-1/PD-L1相互作用に関係する残基の選択置換は、マウスの変異(例えば残基64及び68)で観察され、PD-1とそのPD-L1/L2リガンドとの共進化に起因し得るが; P1内のコアの相互作用領域は保存されたままである。進化的に保存されたP2パッチは、P1パッチに類似する表面領域を占めるが、この領域は、構造的にも機能的にもPD-1に関して既に同定されている役割は有していない。P2パッチが調べた種の中で進化的に保存されていることは、PD-1がP2部位を保存する必要に迫られていたことを示す。この保存は、PD-1エクストドメインが調べた4つの種において62.4%~79.9%しか保存されていないことを考えると、より一層に重要である。ヒトPD-1と比較したこれらの4つの種にわたる全ての変異残基を考慮すると、さらに低い52.3%の配列保存となる(図11c、青の矢印は、図11a及び11bに描かれている構造領域を表す)。この機能的な圧力が、P2パッチが、まだ同定されていないリガンドのための相互作用部位として働くことに起因するのか、高次の複合体形成のための部位として働くことに起因するのか、又はPD-1関連シグナル伝達イベントに関連することに起因するのかは、まだ不明である。しかしながら、P2パッチとオーバーラップする結合エピトープを有する、135C12、139D6、135D1及び136B4などのこの中に記載されている抗PD-1抗体は、この領域の機能的な重要性の直接の証拠を提供する。

10

20

30

40

50

【0094】

この領域がPD-1の機能活性における既存の関与を持たないことを考えると、図11bに示されるPD-1上のP2パッチとオーバーラップする結合を有する135C12により代表される抗体が、PD-1上でアンタゴニスト活性を発揮する新規なメカニズム及び部位を説明することをここに提案する。PD-1のこのP2パッチ領域と相互作用できる他の抗体、抗体断片、又は他のタンパク質結合剤はまた、図9、10及び17-20に実証されるように、PD-1/PD-L1相互作用の遮断を介して作用する抗PD-1抗体とは区別されかつそれに相補的な態様でPD-1のアンタゴニストとして作用することもさらに提案する。PD-1におけるP2パッチ領域の重要性のさらなる例として、136B4抗体は、同様にP2パッチとオーバーラップする抗体135C12、139D6及び135D1と比較して、PD-1上の別個のエピトープに結合する。136B4は、P2パッチの縁(edge)に位置するM17及びM18 PD-1突然変異(M17:アスパラギン102をアラニンへ及びアルギニン104をアラニンへ、M18:アスパラギン酸105をアラニンへ)との結合で、強く低減された親和性を示す。135C12、139D6及び135D1抗体と共に、136B4は、全ての試験した非ブロック抗体の中で最も高い機能活性を示した。

【0095】

実施例5

抗体競合結合試験

表3に列挙する選択抗体の結合エピトープをさらに特徴付けるために、細胞表面PD-1への結合に関して一連の抗体競合試験を実施した。Maxpar(登録商標)抗体ラベリングキット(Fluidigm)を用いて、PD-1上の別個のエピトープに結合する抗体(MK3475、137F2、135C12及び134D2)に化学的にコンジュゲートさせた。この手順において、システイン残基を金属キレートポリマーと結合させるために抗体のジスルフィド結合を部分的に還元する。次に、これらの金属同位体修飾抗体を用いて、表面PD-1の発現レベルを見るために細胞を標識し、マスサイトメトリーにより解析を実施した。PD-1の高発現レベルを有するCD4⁺T細胞を作製するために、

健康なドナー由来の末梢血単核細胞を P H A 及び I L - 2 で刺激し、さらに 5 日間インキュベートした。細胞染色後、ゲーティングを実施して生存 C D 3 ⁺ / C D 4 ⁺ 細胞を選択し、さらにマスサイトメトリーにより各サンプルについて P D - 1 の細胞表面レベルを評価した。抗体競合アッセイにおいて、 2×10^6 細胞のサンプルを、 $15 \mu\text{g} / \text{mL}$ の図 1 2 に示す指示された競合抗体の 1 つと共に 4 で 40 分間インキュベートした。次に、金属同位体で標識した染色抗 P D - 1 抗体 (M K 3 4 7 5、1 3 7 F 2、1 3 5 C 1 2、又は 1 3 4 D 2) を $< 1 \mu\text{g} / \text{mL}$ で細胞に添加し、さらに 20 分間インキュベートし、その後洗浄して非結合抗体を除去し、さらに細胞表面 P D - 1 のレベルについて解析した。マウス I g G 1 アイソタイプ対照抗体を陰性対照として及び参照 (基準) として用いて、抗 P D - 1 競合抗体クローンと共にインキュベートしたサンプルに関する P D - 1 陽性細胞の割合 (%) を計算した。

10

【 0 0 9 6 】

P D - 1 / P D - L 1 相互作用にブロッキング性であるクラス 1 抗 P D - 1 抗体は全て、P D - 1 高細胞を M K 3 4 7 5 又は 1 3 7 F 2 のいずれかで染色した実験において競合的であった (I g G 1 対照に対して 29 % の P D - 1 陽性細胞の染色をもって図 1 2 に示されるように)。いくつかのこれらの抗体のエピトープマッピングが、同一であるか又はオーバーラップする結合部位を有することを考えると、これらの結果は予測される。クラス 1 抗体は、1 3 4 D 2 抗体とも競合的であるか又は部分的に競合的であった (I g G 1 対照に対して 30 ~ 59 % の染色をもって図 1 2 に示されるように)。1 3 4 D 2 は、P D - 1 / P D - L 1 相互作用にブロッキング性ではあるが、主に M 1 5 突然変異とオーバーラップするが M 1 7 突然変異とも程度は低いオーバーラップするエピトープに結合する。クラス 1 抗体は、1 3 5 C 1 2 抗体とは非競合的であることが見いだされ (I g G 1 対照に対して 60 % の P D - 1 陽性細胞の染色 (標識抗体の結合) をもって図 1 2 に示されるように)、これらの抗体が P D - 1 上の別個の部位に結合することを示すエピトープ結合試験を裏付けた。

20

【 0 0 9 7 】

競合相手としてクラス 2 抗体を用いると、M K 3 4 7 5 及び 1 3 7 F 2 の標識抗体は両方とも、I g G 1 対照と比較して結合のわずかな減少で又は全く減少しないで結合する。1 つの例外は、標識 1 3 7 F 2 の P D - 1 結合をブロックした 1 3 5 D 1 抗体である。1 3 5 D 1 のエピトープが M 4 突然変異の近くであることを考えると、M 2 3 突然変異領域における 1 3 7 F 2 抗体結合に多少の立体障害がありそうに思われる。1 3 5 C 1 2 及び 1 3 9 D 6 クロームは、M 4 突然変異をコードする P D - 1 への結合においてシフトを有するが、それらは 1 3 7 F 2 の結合と競合しないことを考えると、これらのクラス 2 抗体の結合は P 2 パッチ領域のより中心にある。1 3 5 C 1 2 抗体はまた、全てが P 2 パッチの縁に見られる M 1 7、M 1 8、M 2 6、M 2 8、及び M 3 1 突然変異において小さなシフトを有していた。競合相手として用いた全てのクラス 2 抗体は、標識 1 3 5 C 1 2 の結合をブロックし、それらが P D - 1 上のオーバーラップするエピトープに結合していることを確認した。ほとんどのクラス 2 競合抗体は P D - 1 への結合に関して標識 1 3 4 D 2 と競合しない。1 3 6 B 4 抗体は、1 3 4 D 2 の結合をブロックする、クラス 2 抗体の例外である。これらの結果は、P D - 1 への 1 3 4 D 2 の結合が、M 1 7 突然変異によって部分的に妨害されるが、主に M 1 3 及び M 1 5 突然変異によって妨害される実施例 3 におけるエピトープ結合試験と一致する。1 3 6 B 4 抗体の結合は、P 2 パッチの縁又は P 2 パッチ内にある M 1 7 及び M 1 8 突然変異によってのみ妨害される。

30

40

【 0 0 9 8 】

クラス 3 抗体は、M K 3 4 7 5 及び 1 3 7 F 2 と競合的又は部分的に競合的であり (図 1 2 に示されるように、I g G 1 対照に対して 30 ~ 59 % の染色として規定される)、かつ 1 3 5 C 1 2 とは非競合的に P D - 1 に結合する。1 3 5 E 1 0 クラス 3 抗体は標識 1 3 4 D 2 と競合的であるが、1 4 0 A 1 クラス 3 抗体は標識 1 3 4 D 2 と非競合的である。エピトープマッピングは、1 4 0 A 1 が、1 3 4 D 2 の結合エピトープ (主に M 1 5 で軽度に M 1 7) とは異なる M 1 3 突然変異の領域で結合することを示す。

50

【0099】

クラス4抗体に関する機能的データの評価において、134D2及び136B5のみが、機能的疲弊回復アッセイにおいてHIV特異的CD8⁺T細胞の増殖の増加につながる有意なアンタゴニスト活性を有する(図12に示されるように>150%の高められた増殖)。これらの抗体も、生化学的アッセイにおいてPD-1とPD-L1との相互作用をブロックし、従って、おそらくPD-1/PD-L1遮断を介してアンタゴニストとして機能する。過剰な136B5は、標識134D2でのPD-1⁺細胞の染色をブロックするため、これらの抗体は類似の又はオーバーラップするエピトープでPD-1に結合する(図12)。残りのクラス4抗体を用いた競合結合データは、それら抗体がPD-1上の多様な部位に結合すること、及びこの結合が全般的に135C12抗体とオーバーラップしないことを示す。122F10抗体は、136B4と類似の又はオーバーラップするエピトープに結合する例外である。なぜなら、これら2つの抗体は抗体競合試験で類似の結合プロファイルを有し(図12)、その両方がM17突然変異PD-1構築物への低減された結合を有する(表11)。

10

【0100】

PD-1の溶媒露出残基でのアミノ酸置換により実施したエピトープマッピング試験(実施例3)及び抗体競合試験(図12)からの情報を組み合わせて、様々な抗PD-1抗体クローンが結合するPD-1上の領域の一貫性のある構造マップを図13a及び13bに示す。これらの結合エピトープは、表11において、ほとんどのクローンに関して異なる色の円形のパッチで示されている。図13aは、PD-1/PD-L1又はPD-1/PD-L2相互作用に関連する残基の大部分を有するPD-1の面を示す。例外は、フレキシブルループ領域において、図13aの左側に見られる残基89及び90である。クローン137F2、139F11、140A1、140G5及びMK3475などの、PD-1/PD-L1相互作用と競合的である最初の抗体セットは全て、PD-1のこの面に結合する。機能的アッセイで最も高いアンタゴニスト活性を有すると同定された2つの抗体(表11)は両方とも、図11a及び13aに示され、PD-1の残基124~126に集中する、P1パッチの中心に結合することに注目されたい。この発見は、137F2と139F11が、顕著に異なる重鎖及び軽鎖CDR配列を有し、かつ本明細書で検討されている抗体クローン全ての配列の整列に基づき別個のファミリーに属するという事実により固められる。抗体クローン134D2と136B5は、生化学的アッセイにおいてPD-1/PD-L1相互作用と競合的であることが示されたが、それらは、M13、M15及びM17突然変異とオーバーラップする、図13bに示すPD-1の領域に結合する。このマッピングされたエピトープに基づくと、これらの抗体は、残基89及び90を含むPD-1上のループ領域の一部であるPD-1の残基85及び86の近くに結合する。残基89及び90は、PD-L1との相互作用に関連する(図2a)ため、このループ領域への結合は、PD-L1への結合を阻害するPD-1における構造的変化を誘導しうる。これらの結果と一致して、抗体競合試験は、競合クラス1抗体の添加が、標識134D2抗体の結合を顕著に低減させることを示す(図12)。

20

30

【0101】

表3に列挙するD-1/PD-L1相互作用に非ブロック性である抗体は全て、PD-1/PD-L1相互作用に関連する残基から離れたエピトープに結合する。強い機能活性(機能的回復アッセイにおいて>150%に高められたCD8⁺T細胞増殖、図12)を有する抗体は全て、図13bに示されているP2パッチとオーバーラップするエピトープにおいて結合する。135C12(全ての試験突然変異体)、139D6(選択された試験突然変異体)、及び135D1(選択された試験突然変異体)抗体クローンは、関連する重鎖及び軽鎖CDR配列を有し、かつM4、M18及びM31突然変異とオーバーラップする部位に結合する。136B4抗体クローンは、別個のCDR配列を有し、M17及びM18突然変異PD-1を用いた際に結合親和性に大きなシフトが見られ、それがP2パッチの縁にある別個のエピトープに結合することを示す。135C12抗体は、136B4クローンと競合的に結合するが、134D2又は136E10クローンのいずれと

40

50

も競合しない。これらの抗体競合結合試験は、P2パッチとオーバーラップするエピトープへの135C12、139D6135C1、及び136B4の結合をさらに支持する。136E10抗体の結合エピトープは、この抗体のPD-1への結合を完全に失効させるM1突然変異に限定される。

【0102】

実施例6

抗体薬物コンジュゲートによる標的細胞殺滅

この中で検討するように、抗体などの結合剤（例えば表3）を、PD-1発現細胞の標的殺滅（targeted killing）を実施するために毒素とコンジュゲートさせてよい。この戦略の治療的利益の例として、大部分がPD-1陽性であるHIV感染CD4⁺T細胞の標的排除が挙げられる。これらの試験を実施するために、2つの異なる抗PD-1抗体（140G5及び136B5）を、抗体のジスルフィド結合の部分的還元後の利用可能なシステイン基を介してPEG4-vc-PAB-PNU-159682（以下、PNUと称する）と化学的にコンジュゲートさせた。抗体薬物コンジュゲート（ADC）を、疎水性相互作用クロマトグラフィ及びサイズ排除クロマトグラフィによりプロファイルし、両方のサンプルが>95%のPNUコンジュゲート抗体を含むことが分かった。ADC殺滅アッセイにおいて、HIV-1ウイルスに慢性感染した患者のPBMCからCD4⁺T細胞を単離した。そのCD4⁺T細胞を、アイソタイプ対照抗体、140G5 mAb、140G5-PNU mAbコンジュゲート、136B5 mAb、又は136B5-PNU mAbコンジュゲートと共にインキュベートした。抗体濃度は全て10µg/mlであり、細胞は、5%CO₂の細胞培養インキュベータ中、37℃で5日間インキュベートした。5日目に、細胞生存性のためのAqua染色及びアポトーシスを受けている細胞を同定するためのAnnexin V染色に加えて、CD4及びPD-1の細胞表面レベルをモニターするために、抗体を用いてフローサイトメトリー解析用に細胞を染色した。図14に示すように、様々な抗体又はADCで処理した全てのサンプルが、PD-1の低～中レベルの発現を有するCD4⁺T細胞において、同等のAqua陽性（図14a）又はAnnexin V陽性（図14b）レベルを有する。しかしながら、高レベルのPD-1を有する細胞集団では、抗PD-1 ADC（図14a及び14bにおける140G5-PNU及び136B5-PNU）で処理したサンプルにおいて、Annexin V陽性細胞及びAqua陽性細胞の量の有意な増加がある。

10

20

30

【0103】

抗PD-1 ADCの潜在的な治療的利益のさらなる証拠を提供するために、様々な抗体又はADC（アイソタイプ対照抗体、140G5 mAb、140G5-PNU mAbコンジュゲート、136B5 mAb、又は136B5-PNU mAbコンジュゲート）で5日間処理したCD4⁺T細胞を、定量的ウイルスアウトグロースアッセイを用いてHIV感染細胞の頻度に関して評価した。このアッセイにおいて、抗体又はADCで処理したHIV感染患者由来の細胞を、未刺激のままにするか、又は抗CD3/抗CD28抗体で刺激し、その後、同種のCD8⁺枯渇PBMCの存在下において、様々な希釈率で培養した。各サンプルからの様々な希釈率のCD4⁺T細胞を用いて試験することにより、抗体又はADCでの5日間の処理の後に、複製可能なウイルスを含む細胞の頻度を評価することができる。CD4⁺T細胞及び同種CD8⁺枯渇PBMCの14日間のインキュベーションの後、複製可能なウイルスを含む細胞の頻度を特定するために、p24 ELISAにおいて、及びHIV RNAの存在に関して試験した。図14に示すPD-1高細胞の特異的枯渇に従い、Annexin V陽性又はAqua陽性であるPD-1高細胞の割合（%）の増加が認められ、それぞれアポトーシス及び細胞死を受けている細胞の増加を示す（図15a及び15b）。図16に示すウイルスアウトグロースアッセイにおいて、5日間、IgG1アイソタイプ対照抗体、抗PD-1抗体（136B5又は140G5）で処理された、或いは処理しないままに置かれた、HIV感染ドナー由来のCD4⁺T細胞のサンプルは全て、同様の複製可能なウイルスを含む細胞の頻度を有する（16～28のHIV-1 RNA陽性細胞/ml（RUPM））。しかしながら、抗PD-1 A

40

50

DC (140G5 - PNU mAb コンジュゲート、136B5 mAb、又は136B5 - PNU mAb コンジュゲート) で処理したサンプルでは、感染性ウイルスを産生できる細胞の4~5倍の減少に一致する感染細胞の頻度の顕著な減少がある。これらの結果は、5日間の抗PD-1 ADC 処理に関連するRUPMの10倍までの減少をもって、いくつかの別の実験で再現されている。従って、これらの試験は、抗PD-1 ADCが、HIV-1陽性患者から感染細胞を枯渇させるための有効な治療法となりうるという考えの*in vitro*での原理証明を提供する。

【0104】

実施例7

マウス抗PD-1抗体のヒト化

マウス抗体のものに最も類似する重鎖及び軽鎖フレームワークをみつけるために、選択抗PD-1クローンのマウスIgG1抗体配列を、ヒト免疫グロブリン生殖細胞系V遺伝子データベースに対して比較した。これらのフレームワーク配列を用いて、コンビナトリアルライブラリーを設計し、それを用いて、ヒト化すべき抗体の重鎖及び軽鎖CDRLループを組み込んだファージディスプレイライブラリーを構築した。次に、ファージライブラリーを、F_c融合構築物において、組換えヒトPD-1に対するパンニング実験で用いた。ファージELISAを用いて、組換えPD-1に結合するヒト化抗PD-1アウトプットファージを評価した。陽性クローンからのF_{a,b}断片DNAを、FASEBA (fast screening for expression, biophysical properties and affinity) ライブラリーに導入し、F_{a,b}タンパク質断片の生成に用いた。これらのF_{a,b}断片を、発現レベル、タンパク質の安定性/生物物理学的特性、及びBiacore試験によって特定されるような組換えヒトF_c-PD-1タンパク質に対する親和性に関して評価した。表3の137F2及び135C12マウス抗体クローンをこのやり方でヒト化し、所望の発現、安定性及び親和性特性を有するクローンに関して得られたVH及びVL配列を以下に示す。ヒト及びサルF_c-PD-1タンパク質に対する137F2及び135C12ヒト化F_{a,b}クローンのBiacore親和性測定の結果を表12及び13にそれぞれ示す。これらの例示的なヒト化抗体の可変領域アミノ酸配列(指示されているように重鎖及び軽鎖)を以下に示す。

【0105】

A. ヒト化137F2重鎖配列

1. マウスVH参照配列

QVQLQQPGAELVRPGT SVKMSCKAAGYTFTNYWIGWIKQR
PGHGLEWIGDIYPGGGYTNYNEKFKGKATLTADTSSSTAY
MQVSSLTSEDTGIYYCARGYDFVLDRWGQGTSVTVSS (配列
番号277)

2. A35790-VH

QMQLVQSGPEVKKPGT SVKVSCKASGFTFTNYWIGWVRQA
PGQALEWMGDIYPGGGYTNYNEKFKGRVTITADKSTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARGYDFVLDRWGQGTTVTVSS (配列
番号139)

3. A35796-VH

QMQLVQSGPEVKKPGT SVKVSCKASGFTFTNYWIGWVRQA
PGQALEWMGDIYPGGGYTNYNEKFKGRVTITADKSTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARGYDFVLDRWGQGTTVTVSS (配列
番号140)

4. A35793-VH

QMQLVQSGPEVKKPGT SVKVSCKASGFTFTNYWIGWVRQA

10

20

30

40

50

P G Q A L E W M G D I Y P G G G Y T N Y N E K F K G R V T I T A D K S T S T A Y
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y D F V L D R W G Q G T T V T V S S (配列
番号 1 4 1)

5 . A 3 5 8 1 8 - V H

Q M Q L V Q S G P E V K K P G T S V K V S C K A S G F T F T N Y W I G W V R Q A
P G Q A L E W M G D I Y P G G G Y T N Y N E K F K G R V T I T A D K S T S T A Y
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y D F V L D R W G Q G T T V T V S S (配列
番号 1 4 2)

10

6 . A 3 5 7 9 5 - V H

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y W I G W V R Q A
P G Q G L E W M G D I Y P G G G Y T N Y N E K F K G R V T I T A D K S T S T A Y
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y D F V L D R W G Q G T T V T V S S (配列
番号 1 4 3)

7 . A 3 5 7 9 7 - V H

E V Q L V Q S G A E V K K H G E S L K I S C K G S G Y S F T N Y W I G W V R Q A
T G Q G L E W M G D I Y P G G G Y T N Y N E K F K G R V T I T A D K S T S T A Y
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y D F V L D R W G Q G T T V T V S S (配列
番号 1 4 4)

20

8 . A 3 5 7 9 9 - V H

Q M Q L V Q S G A E V K K T G S S V K V S C K A S G Y T F T N Y W I G W V R Q M
P G K G L E W M G D I Y P G G G Y T N Y N E K F K G R V T I T A D K S T S T A Y
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y D F V L D R W G Q G T T V T V S S (配列
番号 1 4 5)

9 . A 3 5 8 0 5 - V H

Q V Q L V Q S G S E L K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y W I G W V R Q A
P G K G L E W M G D I Y P G G G Y T N Y N E K F K G R V T I T A D K S T S T A Y
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y D F V L D R W G Q G T T V T V S S (配列
番号 1 4 6)

30

1 0 . 1 3 7 F V H 1

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y W I G W V R Q A
P G Q G L E W M G D I Y P G G G Y T N Y N E K F K G R V T M T R D T S T S T V Y
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y D F V L D R W G Q G T L V T V S S (配列
番号 1 4 7)

40

1 1 . 1 3 7 F V H 2

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A A G Y T F T N Y W I G W V R Q A
P G Q G L E W M G D I Y P G G G Y T N Y N E K F K G R V T M T A D T S T S T V Y
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y D F V L D R W G Q G T L V T V S S (配列
番号 1 4 8)

1 2 . 1 3 7 F V H 1 b

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y W I G W V R Q A
P G Q G L E W I G D I Y P G G G Y T N Y N E K F K G R V T M T A D T S T S T V Y
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y D F V L D R W G Q G T L V T V S S (配列

50

番号 1 4 9)

1 3 . 1 3 7 F V H 1 c

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y W I G W I R Q A
P G Q G L E W I G D I Y P G G G Y T N Y N E K F K G R A T L T A D T S T S T V Y
M E V S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y D F V L D R W G Q G T L V T V S S (配列
番号 1 5 0)

B . ヒト化 1 3 7 F 2 軽鎖配列

1 . マウス V L 参照配列

D I V M S Q S P S S L A V S T G E K V T M T C K S S Q S L F N S E T Q K N Y L A
W Y Q Q K P G Q P P K L L I F W A S T R E S G V P D R F L G S G S G T D F T L T
I S S V Q A E D L A V Y Y C K Q S Y T L R T F G G G T K L E I K (配列番号 2 7 8
)

10

2 . A 3 5 7 9 0 - V L

D V V M T Q S P A F L S V T P G E K V T I T C K S S Q S L F N S E T Q K N Y L A
W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R E S G V P S R F S G S G S G T D F T L T
I S S L Q P E D F A T Y Y C K Q S Y T L R T F G G G T K L E I K (配列番号 1 5 1
)

20

3 . A 3 5 7 9 6 - V L

D V V M T Q S P A F L S V T P G E K V T I T C K S S Q S L F N S E T Q K N Y L A
W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R E S G V P S R F S G S G S G T D F T L T
I S S L Q P E D F A T Y Y C K Q S Y T L R T F G G G T K L E I K (配列番号 1 5 2
)

4 . A 3 5 7 9 3 - V L

D V V M T Q S P A F L S V T P G E K V T I T C K S S Q S L F N S E T Q K N Y L A
W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R E S G V P S R F S G S G S G T D F T F T
I S S L E A E D A A T Y Y C K Q S Y T L R T F G G G T K L E I K (配列番号 1 5 3
)

30

5 . A 3 5 8 1 8 - V L

D V V M T Q S P A F L S V T P G E K V T I T C K S S Q S L F N S E T Q K N Y L A
W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y W A S T R E S G V P S R F S G S G S G T D F T F T
I S S L E A E D A A T Y Y C K Q S Y T L R T F G G G T K L E I K (配列番号 1 5 4
)

6 . A 3 5 7 9 5 - V L

D V V M T Q S P A F L S V T P G E K V T I T C K S S Q S L F N S E T Q K N Y L A
W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y W A S T R E S G V P S R F S G S G S G T D F T L T
I S S L Q P E D F A T Y Y C K Q S Y T L R T F G G G T K L E I K (配列番号 1 5 5
)

40

7 . A 3 5 7 9 7 - V L

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K S S Q S L F N S E T Q K N Y L A
W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R E S G V P S R F S G S G S G T D F T L T
I S S L Q P E D F A T Y Y C K Q S Y T L R T F G G G T K L E I K (配列番号 1 5 6
)

50

8 . A 3 5 7 9 9 - V L

D V V M T Q S P A F L S V T P G E K V T I T C K S S Q S L F N S E T Q K N Y L A
W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R E S G V P S R F S G S G S G T D F T L T
I S S L Q P E D F A T Y Y C K Q S Y T L R T F G G G T K L E I K (配 列 番 号 1 5 7
)

9 . A 3 5 8 0 5 - V L

D V V M T Q S P A F L S V T P G E K V T I T C K S S Q S L F N S E T Q K N Y L A
W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R E S G V P S R F S G S G S G T D F T F T
I S S L E A E D A A T Y Y C K Q S Y T L R T F G G G T K L E I K (配 列 番 号 1 5 8
)

10

1 0 . 1 3 7 F V L 1

D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C K S S Q S L F N S E T Q K N Y L A
W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F S G S G S G T D F T L T
I S S L Q A E D V A V Y Y C K Q S Y T L R T F G Q G T K L E I K (配 列 番 号 1 5 9
)

1 1 . 1 3 7 F V L 2

D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I T C K S S Q S L F N S E T Q K N Y L A
W Y Q Q K P G Q P P K L L I F W A S T R E S G V P D R F L G S G S G T D F T L T
I S S L Q A E D V A V Y Y C K Q S Y T L R T F G Q G T K L E I K (配 列 番 号 1 6 0
)

20

1 2 . 1 3 7 F V L 1 b

D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C K S S Q S L F N S E T Q K N Y L A
W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F S G S G S G T D F T L T
I S S L Q A E D V A V Y Y C K Q S Y T L R T F G Q G T K L E I K (配 列 番 号 1 6 1
)

30

1 3 . 1 3 7 F V L 1 c

D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I T C K S S Q S L F N S E T Q K N Y L A
W Y Q Q K P G Q P P K L L I F W A S T R E S G V P D R F S G S G S G T D F T L T
I S S L Q A E D V A V Y Y C K Q S Y T L R T F G Q G T K L E I K (配 列 番 号 1 6 2
)

1 4 . 1 3 7 F V L 1 d

D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T M T C K S S Q S L F N S E T Q K N Y L A
W Y Q Q K P G Q P P K L L I F W A S T R E S G V P D R F S G S G S G T D F T L T
I S S V Q A E D V A V Y Y C K Q S Y T L R T F G Q G T K L E I K (配 列 番 号 1 6 3
)

40

C . ヒト化 1 3 5 C 1 2 重鎖配列

1 . マウスVH参照配列

E V Q L H Q S G P E L L K P G A S V R M S C K A S G Y T F T N F Y I H W V K Q S
H G K S I E W I G S I Y P N Y G D T A Y N Q K F K D K A T L T V D K S S S T A Y
M A L R S L T S E D S A V Y Y C A R G Y S Y A M D Y W G Q G T S V T V S S (配 列
番 号 2 7 9)

50

2 . A 3 5 7 7 5 - V H

E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K I S C K G S G Y S F T N F Y I H W V R Q A
P G Q R L E W M G S I Y P N Y G D T A Y N Q K F K D R F V F S L D T S V S T A Y
L Q I S S L K A E D T A V Y Y C A R G Y S Y A M D Y W G Q G T T V T V S S (配 列
番 号 1 6 4)

3 . A 3 5 7 8 3 - V H

E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K I S C K G S G Y S F T N F Y I H W V R Q A
R G Q R L E W I G S I Y P N Y G D T A Y N Q K F K D R F V F S L D T S V S T A Y
L Q I S S L K A E D T A V Y Y C A R G Y S Y A M D Y W G Q G T T V T V S S (配 列
番 号 1 6 5)

10

4 . A 3 5 7 7 4 - V H

E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K I S C K G S G Y S F T N F Y I H W V R Q A
P G Q R L E W M G S I Y P N Y G D T A Y N Q K F K D R F V F S L D T S V S T A Y
L Q I S S L K A E D T A V Y Y C A R G Y S Y A M D Y W G Q G T T V T V S S (配 列
番 号 1 6 6)

5 . A 3 6 4 4 3 - V H

E V Q L V Q S G A E V K K P G A T V K I S C K V S G Y T F T N F Y I H W V R Q A
R G Q R L E W I G S I Y P N Y G D T A Y N Q K F K D R V T I T A D K S T S T A Y
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y S Y A M D Y W G Q G T T V T V S S (配 列
番 号 1 6 7)

20

6 . A 3 5 7 7 7 - V H

E V Q L V Q S G A E V K K P G A T V K I S C K V S G Y T F T N F Y I H W V R Q A
P G K G L E W M G S I Y P N Y G D T A Y N Q K F K D R V T I T A D K S T S T A Y
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y S Y A M D Y W G Q G T T V T V S S (配 列
番 号 1 6 8)

30

7 . A 3 5 7 8 9 - V H

E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K I S C K G S G Y S F T N F Y I H W V R Q M
P G K G L E W M G S I Y P N Y G D T A Y N Q K F K D R V T I T A D K S T S T A Y
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y S Y A M D Y W G Q G T T V T V S S (配 列
番 号 1 6 9)

8 . A 3 6 4 4 8 - V H

E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K I S C K G S G Y S F T N F Y I H W V R Q M
P G K G L E W M G S I Y P N Y G D T A Y N Q K F K D R F V F S L D T S V S T A Y
L Q I S S L K A E D T A V Y Y C A R G Y S Y A M D Y W G Q G T T V T V S S (配 列
番 号 1 7 0)

40

9 . A 3 6 4 3 7 - V H

E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K I S C K G S G Y S F T N F Y I H W V R Q M
P G K G L E W M G S I Y P N Y G D T A Y N Q K F K D R F V F S L D T S V S T A Y
L Q I S S L K A E D T A V Y Y C A R G Y S Y A M D Y W G Q G T T V T V S S (配 列
番 号 1 7 1)

1 0 . 1 3 5 C V H 1

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N F Y I H W V R Q A

50

PGQGLEWMGSIYPNYGDTAYNQKFKDRVTMTTRDTSTSTVY
MELSSLRSEDTAVYYCARGYSYAMDYWGQGT LVTVSS (配列
番号172)

11.135C VH2

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFFTNFYIHWVRQA
PGQGLEWMGSIYPNYGDTAYNQKFKDRVTMTVDKSTSTVY
MELRSLRSEDTAVYYCARGYSYAMDYWGQGT LVTVSS (配列
番号173)

10

12.135C VH3

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFFTNFYIHWVKQA
HGQGLEWMGSIYPNYGDTAYNQKFKDRVTMTVDKSTSTVY
MELRSLRSEDTAVYYCARGYSYAMDYWGQGT LVTVSS (配列
番号174)

13.135C VH1b

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFFTNFYIHWVRQA
PGQGLEWIGSIYPNYGDTAYNQKFKDRVTMTVDTSTSTVY
MELSSLRSEDTAVYYCARGYSYAMDYWGQGT LVTVSS (配列
番号175)

20

14.135C VH1c

QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFFTNFYIHWVRQA
PGQGLEWIGSIYPNYGDTAYNQKFKDRATLTVDTSTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARGYSYAMDYWGQGT LVTVSS (配列
番号176)

15.135C VH1d

QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFFTNFYIHWVRQA
PGQGLEWIGSIYPNYGDTAYNQKFKDRATLTVDKSTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARGYSYAMDYWGQGT LVTVSS (配列
番号177)

30

D. ヒト化135C12軽鎖配列

1. マウスVL参照配列

NI VMTQSPKSMMSVGERVTLTCKASENVVTYVSWYQQKP
EQSPKLLIYGASNRYTGVPDRFTGSGSATDFTLTISSVQA
EDLADYHCGQGYSYPYTFGGGKLEIK (配列番号280)

40

2. A35775-VL

DIQMTQSPSSVSA SVGDRVTITCSASQGISGDLNHWYQQKP
GQAPRLLIYHTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
EDFATYYCQYYSKDLLTFGGGKLEIK (配列番号178)

3. A35783-VL

DIQMTQSPSSL S ASV GDRVTITCSASQGISGDLNHWYQQKP
GKTPKLLIYHTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
EDFATYYCQYYSKDLLTFGGGKLEIK (配列番号179)

50

4 . 3 5 7 7 4 - V L

D I Q M T Q S P S S V S A S V G D R V T I T C S A S Q G I S G D L N W Y Q Q K P
G K A P K L L I Y H T S S L H S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
E D F A T Y Y C Q Y Y S K D L L T F G G G T K L E I K (配 列 番 号 1 8 0)

5 . A 3 6 4 4 3 - V L

D I Q M T Q S P S S V S A S V G D R V T I T C S A S Q G I S G D L N W Y Q Q K P
G Q A P R L L I Y H T S S L H S G V P S R F S G S G S G T E F T L T I S R L E P
E D F A V Y Y C Q Y Y S K D L L T F G G G T K L E I K (配 列 番 号 1 8 1)

10

6 . A 3 5 7 7 7 - V L

D I Q M T Q S P S T L S A S V G D R V T I T C S A S Q G I S G D L N W Y Q Q K P
G Q A P R L L I Y H T S S L H S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
E D F A T Y Y C Q Y Y S K D L L T F G G G T K L E I K (配 列 番 号 1 8 2)

7 . A 3 5 7 8 9 - V L

D I Q M T Q S P S S V S A S V G D R V T I T C S A S Q G I S G D L N W Y Q Q K P
G Q A P R L L I Y H T S S L H S G I P A R F S G S G S G T D F T L T I S R L E P
E D F A V Y Y C Q Y Y S K D L L T F G G G T K L E I K (配 列 番 号 1 8 3)

20

8 . A 3 6 4 4 8 - V L

D I Q M T Q S P S T L S A S V G D R V T I T C S A S Q G I S G D L N W Y Q Q K P
G K T P K L L I Y H T S S L H S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
E D F A T Y Y C Q Y Y S K D L L T F G G G T K L E I K (配 列 番 号 1 8 4)

9 . A 3 6 4 3 7 - V L

D I Q M T Q S P S T L S A S V G D R V T I T C S A S Q G I S G D L N W Y Q Q K P
G Q A P R L L I Y H T S S L H S G I P A R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
E D F A V Y Y C Q Y Y S K D L L T F G G G T K L E I K (配 列 番 号 1 8 5)

30

1 0 . 1 3 5 C V L 1

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C S A S Q G I S G D L N W Y Q Q K P
G K A P K L L I Y H T S S L H S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
E D F A T Y Y C Q Y Y S K D L L T F G G G T K L E I K (配 列 番 号 1 8 6)

1 1 . 1 3 5 C V L 2

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C S A S Q G I S G D L N W Y Q Q K P
G K A V K L L I Y H T S S L H S G V P L R F S G S G S G T D Y T L T I S S L Q P
E D F A T Y Y C Q Y Y S K D L L T F G G G T K L E I K (配 列 番 号 1 8 7)

40

1 2 . 1 3 5 C V L 3

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C S A S Q G I S G D L N W Y Q Q K S
D G A V K L L I Y H T S S L H S G V P L R F S G S G S G T D Y T L T I S S L Q P
E D F A T Y Y C Q Y Y S K D L L T F G G G T K L E I K (配 列 番 号 1 8 8)

1 3 . 1 3 5 C V L 1 b

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C S A S Q G I S G D L N W Y Q Q K P
G K A P K L L I Y H T S S L H S G V P S R F S G S G S G T D Y T L T I S S L Q P
E D F A T Y Y C Q Y Y S K D L L T F G G G T K L E I K (配 列 番 号 1 8 9)

50

1 4 . 1 3 5 C V L 1 c

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C S A S Q G I S G D L N W Y Q Q K P
 G K A V K L L I Y H T S S L H S G V P S R F S G S G S G T D Y T L T I S S L Q P
 E D F A T Y Y C Q Y Y S K D L L T F G G G T K L E L K (配列番号 1 9 0) 。

指示されているヒト化抗体の B i a c o r e 結合親和性測定の結果を下記の表 1 2 及び
 1 3 に示す。

【 0 1 0 6 】

【 表 1 2 】

表12

ヒト及びサルの PD-1 に対する 137F2 関連ヒト化抗 PD-1 Fab クローンの
 Biacore 結合親和性測定

10

リガンド	ヒト PD-1			サル PD-1		
	ka (M ⁻¹ /s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	KD (M)	ka (M ⁻¹ /s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	KD (M)
マウス 137F2A11	1.37E+05	2.10E-04	1.54E-09	1.38E+05	3.05E-04	2.22E-09
A35796	1.04E+05	1.23E-04	1.18E-09	9.53E+04	9.81E-05	1.03E-09
A35793	1.04E+05	9.49E-05	9.12E-10	9.32E+04	1.05E-04	1.13E-09
A35818	9.88E+04	1.04E-04	1.06E-09	9.14E+04	1.16E-04	1.27E-09
A35795	1.03E+05	8.24E-05	7.97E-10	9.25E+04	1.52E-04	1.64E-09
A35797	1.00E+05	8.02E-05	8.02E-10	9.37E+04	1.06E-04	1.13E-09
A35799	1.01E+05	7.43E-05	7.34E-10	8.97E+04	1.69E-04	1.88E-09
A35805	9.37E+04	8.78E-05	9.37E-10	8.82E+04	9.49E-05	1.08E-09

20

【 0 1 0 7 】

【 表 1 3 】

表13

ヒト及びサルの PD-1 に対する 135C12 関連ヒト化抗 PD-1 Fab クローンの
 Biacore 結合親和性測定

30

リガンド	ヒト PD-1			サル PD-1		
	ka (M ⁻¹ /s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	KD (M)	ka (M ⁻¹ /s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	KD (M)
マウス 135C12	9.52E+04	1.52E-04	1.60E-09	8.40E+04	2.38E-04	2.83E-09
A35775	8.02E+04	2.03E-04	2.54E-09	6.05E+04	3.47E-04	5.73E-09
A35783	7.68E+04	1.96E-04	2.55E-09	4.21E+05	8.00E-04	1.90E-09
A35774	8.09E+04	2.11E-04	2.61E-09	6.93E+04	1.94E-04	2.79E-09
A36443	7.12E+04	2.15E-04	3.02E-09	9.49E+04	5.85E-04	6.16E-09
A35777	6.86E+04	3.52E-04	5.13E-09	1.15E+05	5.75E-04	5.00E-09
A35789	7.01E+04	2.93E-04	4.17E-09	6.67E+04	4.13E-04	6.19E-09
A36448	8.96E+04	3.86E-04	4.31E-09	NA	NA	NA
A36437	7.10E+04	3.17E-04	4.46E-09	6.07E+04	3.68E-04	6.07E-09

40

【 0 1 0 8 】

実施例 8

抗 PD 1 抗体及びその組合せを用いた T 細胞の刺激

H I V 特異的 C D 8 + T 細胞の増殖をもたらす、慢性感染 H I V ドナー由来の P B M C
 の抗原特異的刺激的結果を図 1 7 ~ 1 9 に示す。ウイルス血症ドナーにおける C D 8 + T
 細胞の疲弊状態により、抗 P D - 1 抗体の添加は、ほぼ 2 0 0 % まで抗原特異的増殖を高

50

める (p 値 < 0.0001)。

【0109】

マウスブロッキング抗PD-1抗体137F2及びマウス非ブロッキング抗PD-1抗体135C12由来のCDRをコードするヒト化抗PD-1抗体を、CFSE機能的疲弊アッセイにおいて、抗原特異的CD8⁺T細胞における機能的疲弊を救済するそれらの能力に関して評価した。ヒト抗体フレームワーク領域中に変形物を有する、137F2及び135C12クローンのいくつかのヒト化抗体を複数のアッセイで試験し、全てが、MK3475、並びに137F2及び135C12のマウス/ヒトキメラ抗体(マウス由来のV_L及びV_H部分、及びIgG4のヒト定常領域)と比較して、CD8⁺T細胞増殖を促進することに関して同様の活性を示した。ウイルス血症ドナーにおけるCD8⁺T細胞の疲弊状態により、抗PD-1抗体の添加は、ほぼ200%まで抗原特異的増殖を高める(p 値 < 0.0001) (図17)。マウスブロッキング抗PD-1抗体(すなわち、PD-1/PD-L1相互作用をブロックする)137F2由来のCDRをコードするヒト化抗PD-1抗体(すなわち、ヒト化抗体A35795(配列番号143及び155を含む)、A35796(配列番号140及び152を含む)及びA35797(配列番号144及び156を含む)、並びにマウス-ヒトキメラ137F2(配列番号8、31、54、77、100、及び123を含む)、並びにマウス非ブロッキング抗PD-1抗体135C12由来のCDRをコードするヒト化抗PD-1抗体(すなわち、ヒト化抗体A35774(配列番号166及び180を含む)、A35783(配列番号165及び179を含む)、A35789(配列番号169及び183を含む)、A36443(配列番号167及び181を含む)、135C H2L2(配列番号173及び187を含む)、135C H1cL1c(配列番号176及び190を含む)、135C H1cL1b(配列番号176及び189を含む)、並びにマウス-ヒトキメラ135C12(配列番号17、40、63、86、109及び132を含む))を、CFSE機能的疲弊アッセイにおいて抗原特異的CD8⁺T細胞における機能的疲弊を救済するそれらの能力に関して評価した。ヒト抗体フレームワーク領域中に変形物を有する、137F2(ブロッキング)及び135C12(非ブロッキング)クローンのいくつかのヒト化抗体を複数のアッセイで試験した。全てが、MK3475、並びに137F2及び135C12のマウス/ヒトキメラ抗体と比較して、CD8⁺T細胞増殖を促進することに関して同様の活性を示した。

10

20

30

【0110】

図18は、PD-1/PD-L1相互作用をブロックする抗体(MK3475又はA35795)と非ブロッキング抗PD-1抗体(A35774)との組合せの結果が、いずれかの抗体単独と比較して、統計的に有意な(p 値 < 0.0001)増殖の増加をもたらしたことを示す。図18に示すデータは、MK3475とA35774との組合せに関して3回の実験の平均、A35795とA35774との組み合わせに関しては4回の実験の平均である。

【0111】

図19は、PD-1/PD-L1相互作用をブロックする抗体(MK3475)と、非ブロッキング抗PD-1抗体(135C H1cL1c(配列番号176及び190を含む)又は135C H1cL1b(配列番号176及び189を含む))との他の組合せの効果を示す。この中に示すように、ブロッキング抗体MK3475と非ブロッキング抗PD-1抗体(135C H1cL1c又は135C H1cL1b)との組合せは、いずれかの抗体単独と比較して、増殖の統計的に有意な増加(示されているように、 p 値 = 0.018又は p 値 < 0.0001)をもたらす。図19に示すデータは、各組合せに関して2回の実験の平均である。

40

【0112】

実施例9

ブロッキング抗PD-1抗体と非ブロッキング抗PD-1抗体との組合せ処理でのJurkat PD-1レポーター細胞の活性化

50

これらの実験では、Jurkat PD-1 NFATレポーター細胞株を、TCRアクチベータ及びPD-L1タンパク質を共発現する一過性トランスフェクト293T細胞株で刺激した。抗PD-1抗体の非存在下では、PD-L1/PD-1相互作用がJurkat細胞の刺激を抑制し、NFATの活性化の低減及びより低いレベルのルシフェラーゼ産生をもたらす。ブロッキング抗PD-1抗体（例えば、MK3475）の添加により、増強されたNFAT活性化、より多くのルシフェラーゼ産生、及びルシフェラーゼ基質の添加により生成される化学発光の量の増加をもたらした。大過剰のPD-1及びPD-L1を用いるこれらの極端なアッセイ条件下において、非ブロッキング抗PD-1抗体（図20AにおけるA35774及び図20Bにおける135C H1cL1cにより代表される）は、ブロッキング抗PD-1抗体と比較して低減された活性を有する。しかしながら、ブロッキング抗PD-1抗体と非ブロッキング抗PD-1抗体との組合せは、T細胞活性化を、MK3475単独で達成されるよりも高いレベルにさらに高める。ブロッキング抗PD-1抗体及び非ブロッキング抗PD-1抗体を用いたこのNFAT活性化の増強は、各試験抗体の低濃度及び高濃度の両方で見られる。示されたデータは、ブロッキング抗体MK3475+非ブロッキングA35774（図20A）又はブロッキング抗体MK3475+非ブロッキング抗体135C H1cL1c（図20B）のいずれかの組合せに関して示された、NFAT活性化の統計的に有意な増加を有する3回の繰返し実験の平均である。

10

【0113】

実施例 10

20

抗PD-1抗体処理での細胞表面PD-1のインターナリゼーション

PD-1の高い基底レベルを有するメモリーT細胞を持つ慢性感染HIVドナー由来のPBMCを、ブロッキング抗PD-1抗体、非ブロッキング抗PD-1抗体、又はブロッキング抗PD-1抗体と非ブロッキング抗PD-1抗体との組合せのいずれかと共にインキュベートして、PD-1インターナリゼーションに対する効果を特定した（図21）。48時間～72時間にわたり、フローサイトメトリーによりメモリーCD4⁺T細胞（図21a、c、及びe）並びにCD8⁺T細胞（図21b、d、及びf）においてPD-1の細胞表面レベルをモニターして、抗PD-1抗体が細胞表面PD-1インターナリゼーションを誘導するか否かを特定した。A35795（配列番号143及び155を含む）及びA35774（配列番号166及び180を含む）（図21a、b）；MK3475及びA35774（配列番号166及び180を含む）（図21c、d）；並びに、A35795（配列番号143及び155を含む）及び135C H1cL1c（配列番号176及び190を含む）（図21、e、f）の抗体の組合せを用いた3つの別個の実験を示す。全ての場合に、ブロッキング抗PD-1抗体（A35795又はMK3475により代表される）と、非ブロッキング抗PD-1抗体（A35774（配列番号166及び180を含む）又は135C H1cL1c（配列番号176及び190）を含む）との組合せは、PD-1受容体のより迅速及び/又はより著しいインターナリゼーションを誘導することが観察された。各実験において、PBMCを、ヒトIgG4アイソタイプ対照抗体と共にインキュベートし、それは細胞培養インキュベーションを通してPD-1の高いレベルを維持した未処理T細胞用の参照としての役割を果たした。PD-1の細胞表面発現の低減は、PD-1/PD-L1相互作用を介したT細胞の負の調節を制限できるため、メカニズム的に、PD-1のインターナリゼーションは、抗PD-1抗体（ブロッキング及び非ブロッキング抗体の単独又は組合せのいずれか）のアンタゴニスト機能活性に寄与しうる。

30

40

【0114】

実施例 11

抗PD-1抗体処理後のIFN- γ 産生

PD-1の高い基底レベルを有するメモリーT細胞を持つ慢性感染HIVドナー由来のPBMCを、ブロッキング抗PD-1抗体、非ブロッキング抗PD-1抗体、又はブロッキング抗PD-1抗体と非ブロッキング抗PD-1抗体との組合せのいずれかと共にイン

50

キュベートした。次に、P B M C / 抗体混合物を、抗 C D 3 T C R アクチベータを発現する又は抗 C D 3 T C R アクチベータ及び P D - L 1 を共発現するように一過性トランスフェクトされた 2 9 3 T 細胞の上に積層した。P D - L 1 の存在下又は非存在下における T C R アクチベータ発現細胞での 2 4 時間の刺激の後、上清を採取し、E L I S A で I F N - 産生を分析した。抗 C D 3 T C R アクチベータ発現細胞で刺激した場合、抗体処理サンプルの全てにおいて同様のレベルの I F N - が検出された (図 2 2 A) 。対照的に、抗 C D 3 T C R アクチベータ及び P D - L 1 を共発現する細胞で刺激した場合、I g G 4 アイソタイプ対照で処理したサンプルではより低いレベルの I F N - が検出され、抗 P D - 1 抗体で処理したサンプルでは I F N - 産生が増強された。ブロッキング抗 P D - 1 抗体 (M K 3 4 7 5) 及び非ブロッキング抗 P D - 1 抗体 (A 3 5 7 7 4) の両方で処理したサンプルにおいて最も高いレベルのサイトカイン産生が認められた (* p < 0 . 0 5) 。

10

【 0 1 1 5 】

別の実験において、P D - 1 の高い基底レベルを有するメモリー T 細胞を持つ慢性感染 H I V ドナー由来の P B M C を、非ブロッキング抗 P D - 1 抗体 (A 3 5 7 7 4) 、ブロッキング抗 P D - 1 抗体 (M K 3 4 7 5) 、又はブロッキング抗 P D - 1 抗体と非ブロッキング抗 P D - 1 抗体との組合せ (M K 3 4 7 5 及び A 3 5 7 7 4) のいずれかと共にインキュベートした (図 2 2 B) 。次に、P B M C / 抗体混合物を、抗 C D 3 T C R アクチベータ及び P D - L 1 タンパク質を共発現するように一過性トランスフェクトされた 2 9 3 T 細胞の上に積層した。G o l g i P l u g (商標) タンパク輸送阻害剤を添加し、細胞を約 1 8 時間インキュベートして、細胞内にサイトカインを蓄積させた。フローサイトメトリーにより、各抗体処理条件に関して I F N - 産生細胞の割合 (%) を評価した (図 2 2 B) 。I F N - の産生は、抗 P D - 1 処理を受けた P D - 1 陽性細胞で増加し、ブロッキング抗体 (M K 3 4 7 5) と非ブロッキング (A 3 5 7 7 4) 抗体との組合せは、サイトカイン産生の更なる増加をもたらした (P D - 1 + C D 8 T 細胞についてデータを示す) 。

20

【 0 1 1 6 】

実施例 1 2

結晶構造解析

組換え発現された精製ヒト P D - 1 タンパク質 (受容体エクドメインの残基 3 3 ~ 1 5 0 (「 h P D 1 」)) を、ヒト化 A 3 5 7 7 4 抗体の F a b 断片と共にインキュベートし、複合体をサイズ排除クロマトグラフィにより精製した。h P D - 1 / F a b A 3 5 7 7 4 (配列番号 1 6 6 及び 1 8 0 を含む) 複合体に関してタンパク質結晶を作製し、X 線結晶構造解析によりその構造を解明した。図 2 3 A の共結晶構造は、h P D - 1 と相互作用する A 3 5 7 7 4 (配列番号 1 6 6 及び 1 8 0 を含む、C D R は配列番号 1 7 、 4 0 、 6 3 、 8 6 、 1 0 9 、 及び 1 3 2 により表される) の重鎖及び軽鎖 C D R ループを示す。そのデータは、A 3 5 7 7 4 のための P D - 1 上の結合エピトープとして機能する主要な残基が、V_H C D R ループに関して F 3 7 、 P 3 9 、 A 4 0 、 L 4 1 、 V 4 3 、 L 1 3 8 、 R 1 3 9 及び R 1 4 3 、並びに V_L C D R ループに関して P 3 4 、 E 1 3 6 、 S 1 3 7 及び R 1 3 9 を含むことを示す。これらの構造試験は、実施例 3 及び 5 で説明したように、A 3 5 7 7 4 と同じ重鎖及び軽鎖 C D R を持つマウス 1 3 5 C 1 2 抗体を用いて実施したエピトープマッピングと一致する。アミノ酸置換をコードする P D - 1 を用いたそれらの抗体結合実験において、1 3 5 C 1 2 抗体と、P D - 1 突然変異体 M 4 (置換 S 3 6 A / P 3 7 A / L 4 1 A を含む) 、M 2 6 (置換 R 1 3 9 A / E 1 4 1 A を有する) ; 及び P D - 1 突然変異体 M 3 1 (置換 L 1 4 1 A / V 1 4 3 L を有する) との間で結合のシフトが認められた。1 3 5 C 1 2 の結合親和性に小さなシフトをもたらした他の P D - 1 突然変異 (M 1 7 、 M 1 8 及び M 2 8 にある) は、P D - 1 上の A 3 5 7 7 4 F_a b の結合部位に極めて近接しており、これらのアミノ酸置換は、これら試験において抗体結合親和性を低減させた P D - 1 の局所的構造変化を導入しうる。共結晶構造解析、エピトープマッピング、及び抗体競合結合試験は総合して、P 2 バッチ領域とオーバーラップ

30

40

50

する抗体結合が、PD-1/PD-L1遮断を介して作用する抗体とは区別されるアンタゴニスト機能活性を持つことができることの確証を提供する。A35774により代表される抗体がPD-1とPD-L1との間の相互作用をブロックしないことの追加の証拠を図23Bに提供する。図23Bでは、我々のhPD-1/F_{a,b}A35774共結晶構造と、PD-1のPD-L1との共結晶構造4ZQKとの間でモデルが作製された。このモデルは、ヒトPD-1に対するA35774F_{a,b}及びPD-L1タンパク質のオーバーラップしない結合を示す(図23B)。

【0117】

実施例13

In vivo有効性試験

キイトルーダ(MK3475)と比較して、非ブロッキング抗PD-1抗体135C H1cL1c(配列番号176及び190を含む)の治療的有効性を評価するために、PD-1 HuGEMMマウスにおいてin vivo有効性試験を行い、それぞれ10mg/kgで隔週(bi-weekly)投与した(図24)。追加の治療的処置は、135C H1cL1c及びキイトルーダを各5mg/kgで隔週共投与することを含む。HuGEMMマウスは、受容体エクトドメインの大部分がヒトPD-1タンパク質(ヒトPD-1配列の残基26~146)をコードするヒト/マウスキメラPD-1タンパク質を発現するように遺伝子操作された。in vivo試験の前に、フローサイトメトリー試験により、135C H1cL1c及びキイトルーダ抗PD-1抗体が、刺激されたT細胞の表面でHuGEMMヒト/マウスキメラPD-1に特異的に結合したことを確認した。その試験のための調製において、腫瘍発生のために大腸腺がん由来のMC38細胞を多数のPD-1 HuGEMMマウスに皮下接種した。腫瘍が約95mm³±50の体積に達したときに、合計40匹のマウスを、84mm³の平均腫瘍サイズを有する4つの群に無作為化し、試験0日目に投与(ビヒクル、135C H1cL1c、キイトルーダ及び135C H1cL1c+キイトルーダ)を開始した。治療的抗PD-1抗体を隔週投与し、腫瘍サイズ及びマウスの体重を1週間に2回測定した。未処置PBSバッファビヒクル対照マウスと対比して腫瘍増殖阻害をモニターし、効果をキイトルーダと比較した。非ブロッキング抗PD-1抗体135C H1cL1cは、キイトルーダに匹敵するレベルで腫瘍増殖の低減を誘導した。135C H1cL1cとキイトルーダとの共投与も、10mg/kgでのキイトルーダ単独投与と少なくとも同程度の効果である細胞増殖の低減を誘導した。しかしながら、試験中の全ての処理後時点において、135C H1cL1cとキイトルーダとの組合せで処置されたマウスは、キイトルーダ陽性対照と比較して、応答の向上及びより小さな平均腫瘍体積の傾向を示した。重要なこととして、135C H1cL1cとキイトルーダとの組合せは、(統計解析のためにペアワイズウィルコクソン検定を用いて)試験の4日目(p値=0.0676、統計的限界近く)、7日目(p値=0.0266)、11日目(p値=0.0067)、14日目(p値=0.0037)、及び17日目(p値=0.0021)に、ビヒクル対照と比較して腫瘍体積の統計的に有意な減少を示した。対照的に、キイトルーダ単独の投与は、11日目(p値=0.0205)、14日目(p値=0.0145)、17日目(p値=0.0145)に、ビヒクル対照と比較して腫瘍体積の統計的に有意な低減を示しただけである。135C H1cL1c単独の投与は、試験の11日目(p値=0.0266)、14日目(p値=0.0062)、及び17日目(p値=0.0044)に、ビヒクル対照と比較して腫瘍体積の統計的に有意な低減を示した(図24A)。ビヒクル対照と比較したMC38腫瘍体積の平均阻害パーセンテージ(%)に関するデータの解釈も、単独で投与されたキイトルーダ又は135C H1cL1cと比較して、135C H1cL1cとキイトルーダとの組合せの抗腫瘍活性の向上の強い傾向を示す(図24B)。このプロファイルは、ブロッキング(例えば、キイトルーダ又はMK3475)抗PD-1抗体と非ブロッキング(135C H1cL1c)抗PD-1抗体との組合せが、T細胞機能活性(例えば、増殖(実施例2及び8)、並びにサイトカイン産生(実施例11))の増強を引き起こすことのin vitroの証拠を支持する。更なる所見は、抗体の同じ総量を各試験群に投与した(キイト

10

20

30

40

50

ルーダ：10 mg / kg、並びに135C H1cL1cと及びキイトルーダ：各5 mg / kg)にもかかわらず、キイトルーダ単独と比較して、H1cL1cとキイトルーダとの組合せがかなり早い時点(試験の4又は7日目)で抗腫瘍効果を発揮し始めることである。最後に、in vivo腫瘍モデルデータを、抗体治療中にM38腫瘍の完全寛解を経験したマウスの割合(%) (図24C)に関して説明する。135C H1cL1cとキイトルーダの組合せで見られた腫瘍阻害(%)の向上と一致して、この試験群(135C H1cL1cとキイトルーダとの組合せ)は、移植腫瘍の完全寛解を有したマウスの2倍増加を示した(キイトルーダ又は135C H1cL1cのいずれかをそれぞれ/単独で投与した群での2匹のマウスに対して、135C H1cL1cとキイトルーダとの組合せにおける4匹のマウス)。合わせて、このin vivoデータは、P2パッチとオーバーラップするPD-1のエピトープに対する、PD-1/PD-L1相互作用に非ブロッキング性である結合が、腫瘍特異的免疫応答を活性化し、それがPD-1/PD-L1遮断を介して作用する抗PD-1抗体とは区別されかつそれと共働的であることを確認する。

10

【0118】

所定の実施形態を好ましい実施形態に関して記載しているが、変形及び修飾が当業者に考え付くことを理解されたい。従って、添付の特許請求の範囲は、請求項の範囲に入る全てのそのような等価の変形をカバーすることが意図されている。

【0119】

参考文献

20

1. Chun TW et al. Nature 387: 183 - 188, 1997
2. Chun TW et al. Proc Natl Acad Sci USA 94: 13193 - 13197, 1997
3. Finzi D et al. Science 278: 1295 - 1300, 1997
4. Chomont N et al. Nat Med 15: 893 - 900, 2009
5. Siliciano JD et al. Nat Med 9: 727 - 728, 2003
6. Perreau M et al. J Exp Med 210: 143 - 156, 2013
7. Rong L及びPerelson A J Theoret Biol 260: 308 - 331, 2009
8. Sigal A et al. Nature 477: 95 - 98, 2011
9. Katlama C et al. Lancet 381: 2109 - 2117, 2013
10. Hansen SG et al. Nature 503: 100 - 106, 2013
11. Klein F et al. Nature 492: 518 - 522, 2012
12. Barouch DH et al. Nature 503: 224 - 228, 2013
13. Trautmann L et al. Nat Med 12: 1198 - 1202, 2006
14. Day CL et al. Nature 443: 350 - 354, 2006
15. Archin NM et al. Nature 487: 482 - 485, 2012
16. Sievers EL and Senter PD Annu Rev Med 50

30

40

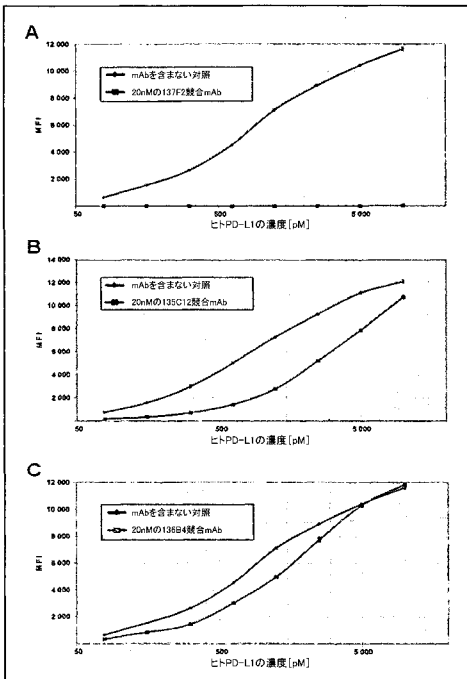
50

. 64 : 15 - 29 , 2013

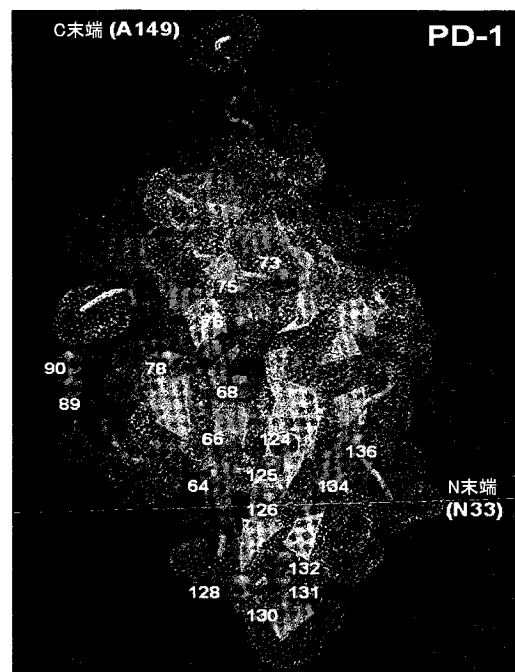
17 . Zolot RS et al . Nat Rev Drug Discov 4

: 259 - 260 , 2013

【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 F 】

23. M23

1 MQIPQAPWPV VVAVLQLGWR PGWFLDSDPR FWNPTTFSPA LLVVTEGDNA TETCSFSNNTS
61 ESFVLNMYRM SPSNOTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRTVQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT
121 YLCCGASLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPSP RPAGQFOTLV VGVVGGLLGS
181 LVLVWVLAIV ICSRAARGTI GARRTGOPLK EDPASVPVFS VDYGELDFQW REKTPPEPPVP
241 CVPEQTEYAT IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL (配列番号 266)

24. M24

1 MQIPQAPWPV VVAVLQLGWR PGWFLDSDPR FWNPTTFSPA LLVVTEGDNA TETCSFSNNTS
61 ESFVLNMYRM SPSNOTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRTVQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT
121 YLCCGASLAP TAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPSP RPAGQFOTLV VGVVGGLLGS
181 LVLVWVLAIV ICSRAARGTI GARRTGOPLK EDPASVPVFS VDYGELDFQW REKTPPEPPVP
241 CVPEQTEYAT IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL (配列番号 267)

25. M25

1 MQIPQAPWPV VVAVLQLGWR PGWFLDSDPR FWNPTTFSPA LLVVTEGDNA TETCSFSNNTS
61 ESFVLNMYRM SPSNOTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRTVQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT
121 YLCCGASLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPSP RPAGQFOTLV VGVVGGLLGS
181 LVLVWVLAIV ICSRAARGTI GARRTGOPLK EDPASVPVFS VDYGELDFQW REKTPPEPPVP
241 CVPEQTEYAT IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL (配列番号 268)

26. M26

1 MQIPQAPWPV VVAVLQLGWR PGWFLDSDPR FWNPTTFSPA LLVVTEGDNA TETCSFSNNTS
61 ESFVLNMYRM SPSNOTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRTVQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT
121 YLCCGASLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPSP RPAGQFOTLV VGVVGGLLGS
181 LVLVWVLAIV ICSRAARGTI GARRTGOPLK EDPASVPVFS VDYGELDFQW REKTPPEPPVP
241 CVPEQTEYAT IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL (配列番号 269)

27. M27

1 MQIPQAPWPV VVAVLQLGWR PGWFLDSDPR FWNPTTFSPA LLVVTEGDNA TETCSFSNNTS
61 ESFVLNMYRM SPSNOTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRTVQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT
121 YLCCGASLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPSP RPAGQFOTLV VGVVGGLLGS
181 LVLVWVLAIV ICSRAARGTI GARRTGOPLK EDPASVPVFS VDYGELDFQW REKTPPEPPVP
241 CVPEQTEYAT IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL (配列番号 270)

28. M28

1 MQIPQAPWPV VVAVLQLGWR PGWFLDSDPR FWNPTTFSPA LLVVTEGDNA TETCSFSNNTS
61 ESFVLNMYRM SPSNOTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRTVQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT
121 YLCCGASLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPSP RPAGQFOTLV VGVVGGLLGS
181 LVLVWVLAIV ICSRAARGTI GARRTGOPLK EDPASVPVFS VDYGELDFQW REKTPPEPPVP
241 CVPEQTEYAT IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL (配列番号 271)

【 図 3 G 】

29. M29

1 MQIPQAPWPV VVAVLQLGWR PGWFLDSDPR FWNPTTFSPA LLVVTEGDNA TETCSFSNNTS
61 ESFVLNMYRM SPSNOTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRTVQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT
121 YLCCGASLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPSP RPAGQFOTLV VGVVGGLLGS
181 LVLVWVLAIV ICSRAARGTI GARRTGOPLK EDPASVPVFS VDYGELDFQW REKTPPEPPVP
241 CVPEQTEYAT IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL (配列番号 272)

30. M30

1 MQIPQAPWPV VVAVLQLGWR PGWFLDSDPR FWNPTTFSPA LLVVTEGDNA TETCSFSNNTS
61 ESFVLNMYRM SPSNOTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRTVQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT
121 YLCCGASLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPSP AAAGQFOTLV VGVVGGLLGS
181 LVLVWVLAIV ICSRAARGTI GARRTGOPLK EDPASVPVFS VDYGELDFQW REKTPPEPPVP
241 CVPEQTEYAT IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL (配列番号 273)

31. M31

1 MQIPQAPWPV VVAVLQLGWR PGWFLDSDPR FWNPTTFSPA ALLVVTEGDNA TETCSFSNNTS
61 ESFVLNMYRM SPSNOTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRTVQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT
121 YLCCGASLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPSP RPAGQFOTLV VGVVGGLLGS
181 LVLVWVLAIV ICSRAARGTI GARRTGOPLK EDPASVPVFS VDYGELDFQW REKTPPEPPVP
241 CVPEQTEYAT IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL (配列番号 274)

【 図 3 H 】

ヒトPD-1アミノ酸配列(アクセッション番号NM_005018.2)

1 MQIPQAPWPV VVAVLQLGWR PGWFLDSDPR FWNPTTFSPA LLVVTEGDNA TETCSFSNNTS
61 ESFVLNMYRM SPSNOTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRTVQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT
121 YLCCGASLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPSP RPAGQFOTLV VGVVGGLLGS
181 LVLVWVLAIV ICSRAARGTI GARRTGOPLK EDPASVPVFS VDYGELDFQW REKTPPEPPVP
241 CVPEQTEYAT IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL (配列番号 275)

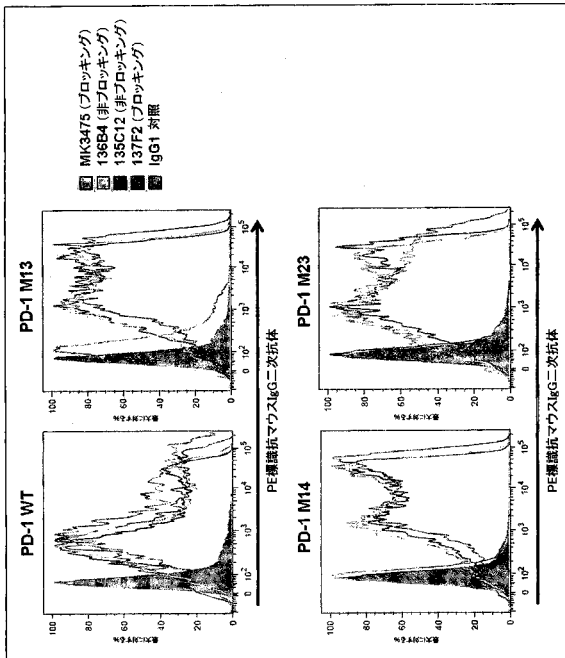
【 図 3 I 】

赤毛サルPD-1アミノ酸配列(アクセッション番号NM_001114358.1)

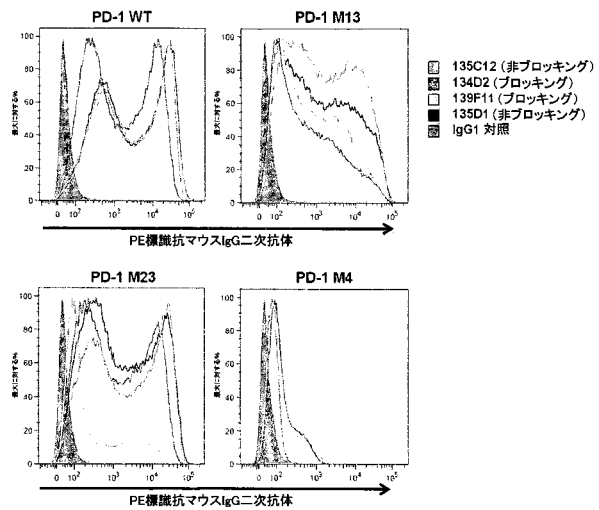
(ヒトPD-1との違いをボールド体で強調表示)

1 MQIPQAPWPV VVAVLQLGWR PGWFLDSDPR FWNPTTFSPA LLVVTEGDNA TETCSFSNNTS
61 ESFVLNMYRM SPSNOTDKLA AFPEDRSQPG RDCRFRTVQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT
121 YLCCGASLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPSP RPAGQFOTLV VGVVGGLLGS
181 LVLVWVLAIV ICSRAARGTI EARRTGOPLK EDPASVPVFS VDYGELDFQW REKTPPEPPVP
241 CVPEQTEYAT IVFPSGLGTS SPARRGSADG PRSDRPLRPE DGHCSWPL (配列番号 276)

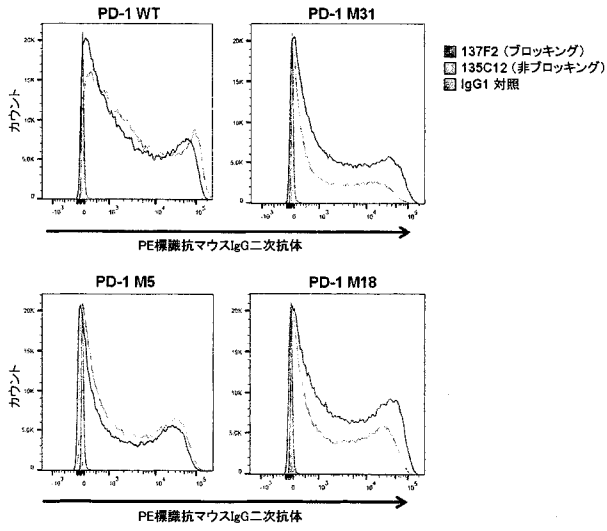
【 図 4 】



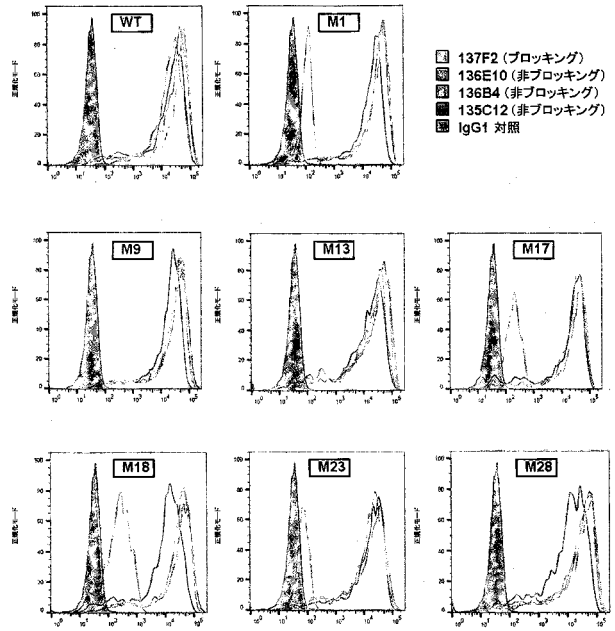
【 図 5 】



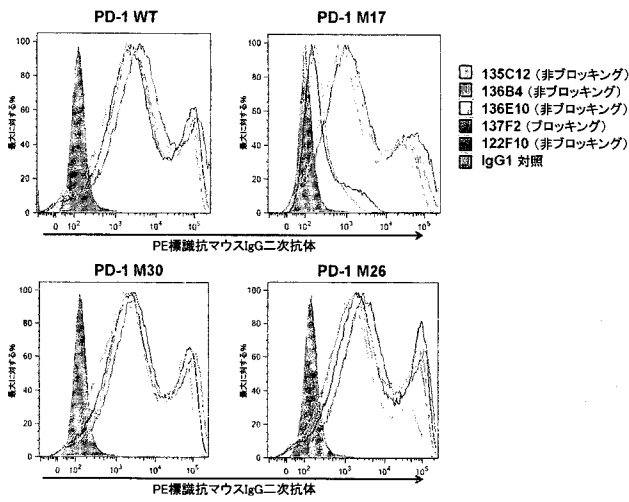
【 図 6 】



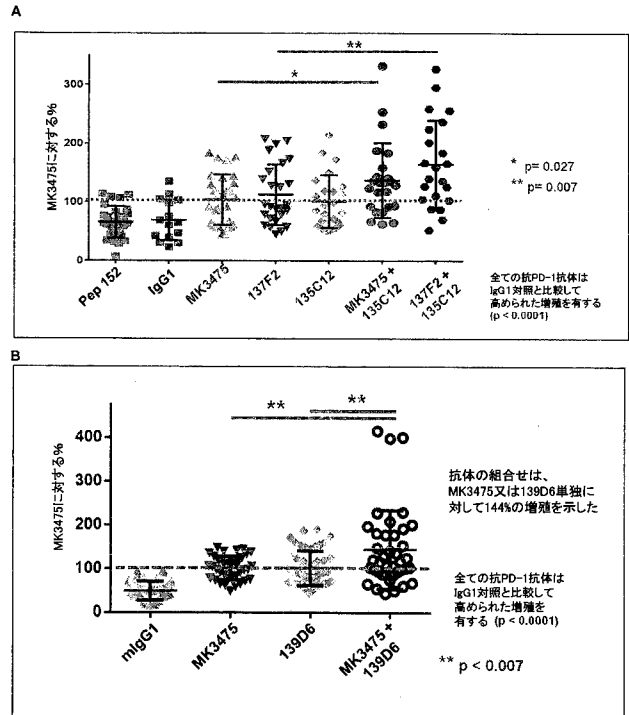
【 図 7 】



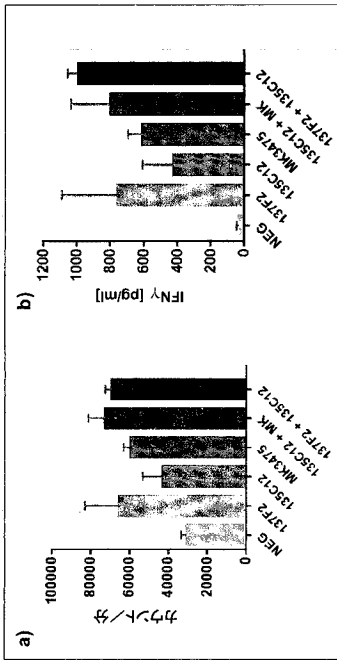
【 図 8 】



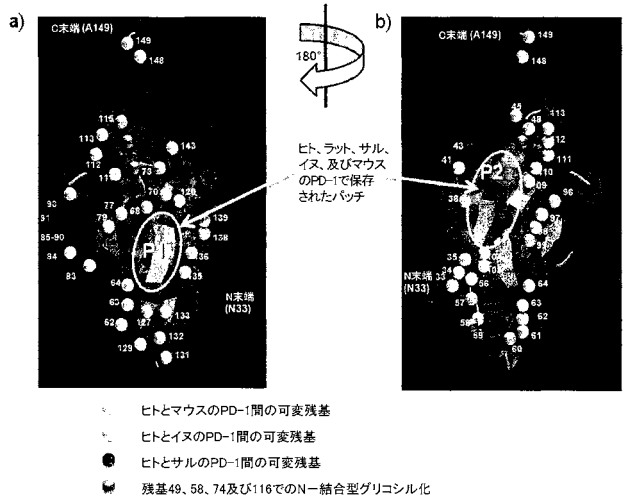
【 図 9 】



【 図 1 0 】

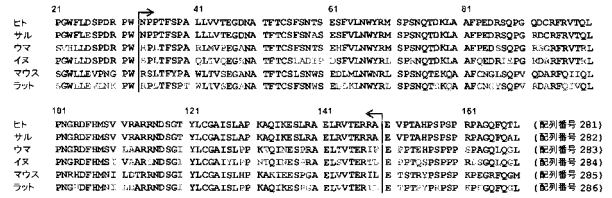


【 図 1 1 - 1 】



【 図 1 1 - 2 】

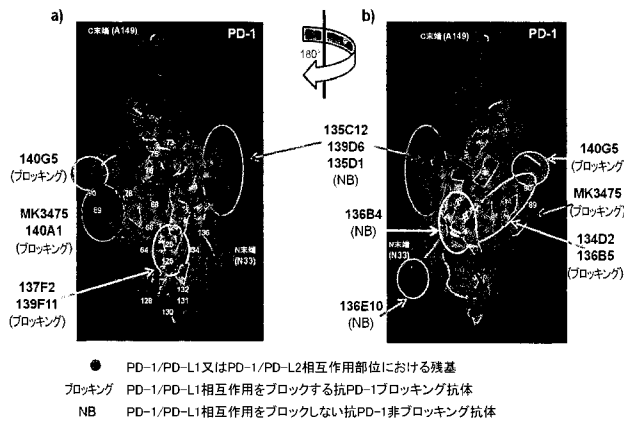
異なる種由来のエクドメインアミノ酸配列の整理



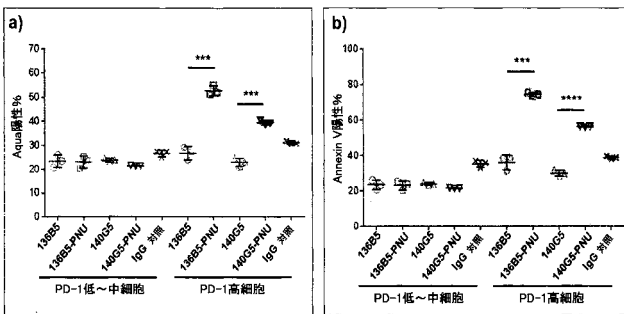
【 図 1 2 】

融合抗体クローン	親和性 (KD)	結合シフト (Luminex 読取)	機能的效果: OFSE/OD8 T細胞の%	PD-1/PD-L1 相互作用の阻害	競合mAbの存在下での 標識mAbの結合			
					MK3475	137F2	135C12	134D2
137F2	1.5	1	250%	ブロッキング				
139F11	3.1	1	252%	ブロッキング				
140G5	1.6	1	195%	ブロッキング				
131D11	2.7	1	190%	ブロッキング				
135C12	1.7	2	195%	非ブロッキング				
139D6	2.4	2	195%	非ブロッキング				
136B4	1.4	2	202%	非ブロッキング				
135D1	6.5	2	187%	非ブロッキング				
140A1	1.4	3	160%	ブロッキング				
135E10	1.5	3	165%	ブロッキング				
134D2	4.8	4	202%	ブロッキング				
136E10	7.1	4	133%	非ブロッキング				
136F4	8.3	4	108%	非ブロッキング				
121G1	11.9	4	120%	非ブロッキング				
136B5	7.7	4	200%	ブロッキング				
122F10	2.2	4	140%	非ブロッキング				
BMS-5C4	0.6	1	175%	na				
MK3475	0.5	1	198%	ブロッキング				
IgG1	na	na	100%	非ブロッキング				

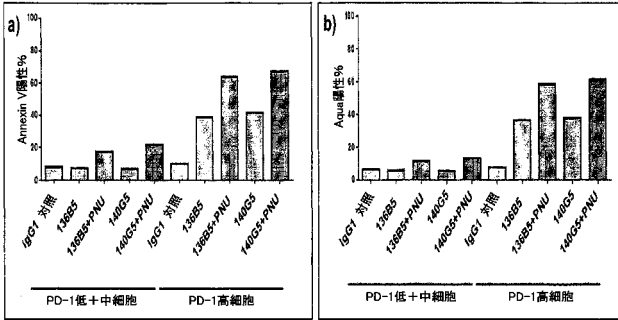
【 図 1 3 】



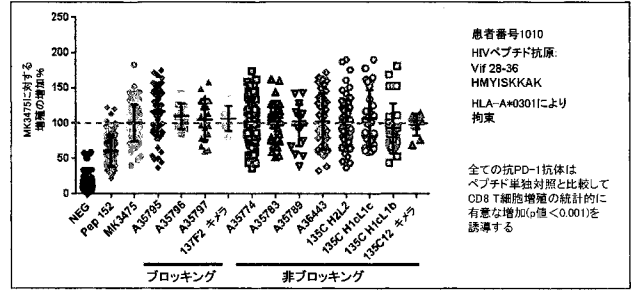
【 図 1 4 】



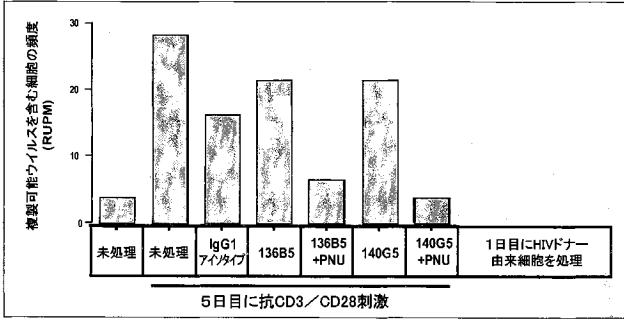
【 図 1 5 】



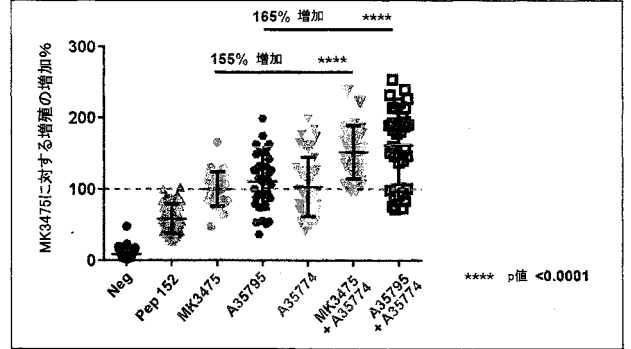
【 図 1 7 】



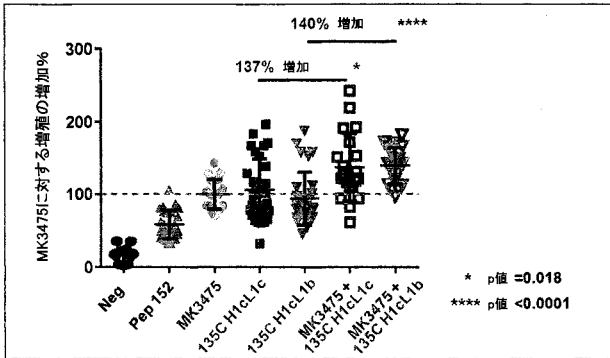
【 図 1 6 】



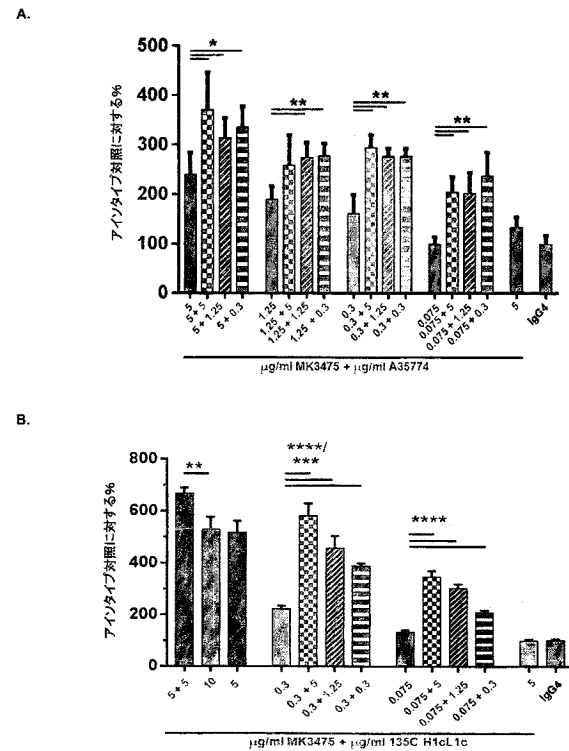
【 図 1 8 】



【 図 1 9 】

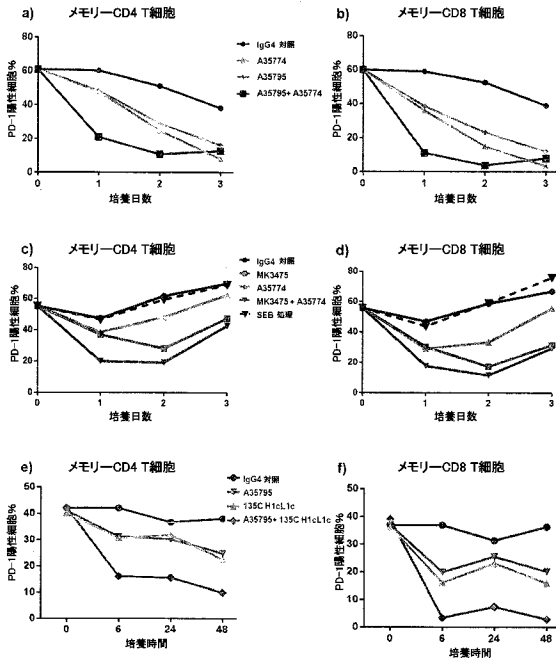


【 図 2 0 】

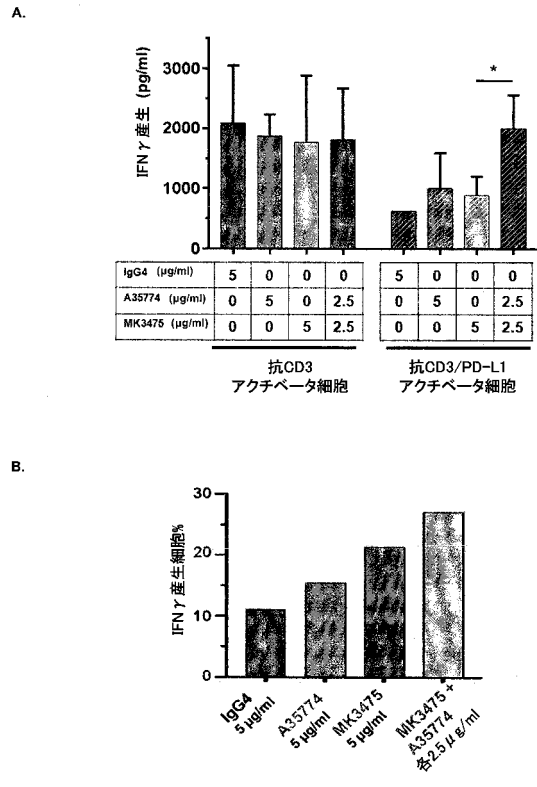


* p値 = 0.05 to 0.01, ** p値 < 0.01, *** p値 < 0.001, **** p値 < 0.0001

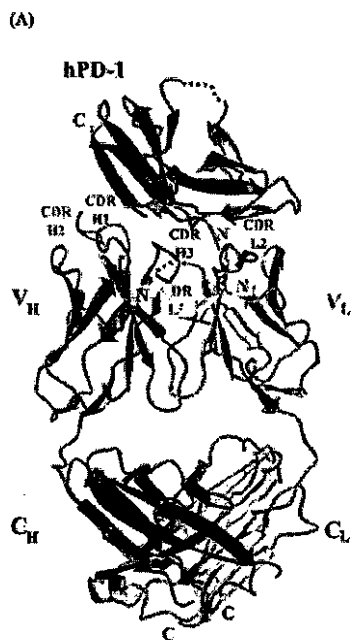
【 図 2 1 】



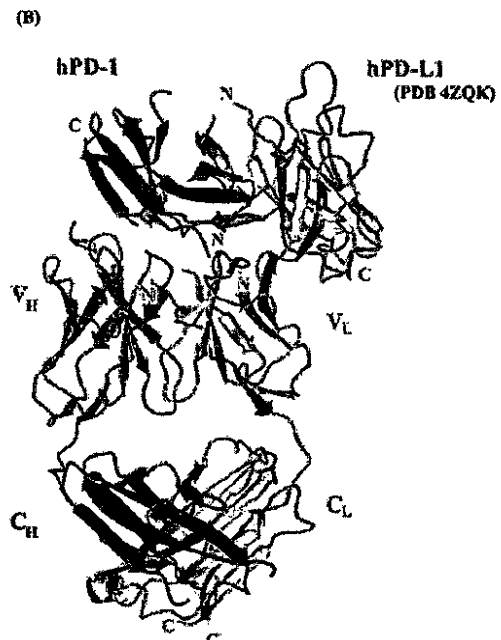
【 図 2 2 】



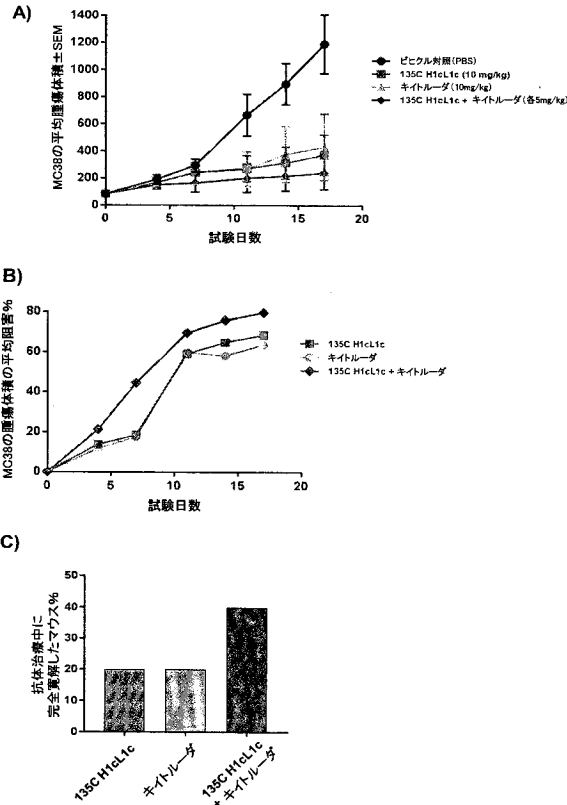
【 図 2 3 (A) 】



【 図 2 3 (B) 】



【図 2 4】



【図 2 5 A】

137F2可変重(VH)鎖

マウス QVQLQQPGAEIIVRPGTSTVSKMSCKAAGYFTFNWYIGWVIRQAPGQALEWNGDIYPGGGYTNY
A35790 QMQLVQSGPEVKKPGTSTVSKVSKASGFTFNWYIGWVIRQAPGQALEWNGDIYPGGGYTNY
A35796 QMQLVQSGPEVKKPGTSTVSKVSKASGFTFNWYIGWVIRQAPGQALEWNGDIYPGGGYTNY
A35793 QMQLVQSGPEVKKPGTSTVSKVSKASGFTFNWYIGWVIRQAPGQALEWNGDIYPGGGYTNY
A35818 QMQLVQSGPEVKKPGTSTVSKVSKASGFTFNWYIGWVIRQAPGQALEWNGDIYPGGGYTNY
A35795 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFNWYIGWVIRQAPGQALEWNGDIYPGGGYTNY
A35797 EVQLVQSGAEVKKHGESLKIISCKGSGYFTFNWYIGWVIRQAPGQALEWNGDIYPGGGYTNY
A35799 QMQLVQSGAEVKKPGTSTVSKVSKASGYFTFNWYIGWVIRQAPGQALEWNGDIYPGGGYTNY
A35805 QVQLVQSGSELKIFGASVKVSKASGYFTFNWYIGWVIRQAPGQALEWNGDIYPGGGYTNY
VH1 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFNWYIGWVIRQAPGQALEWNGDIYPGGGYTNY
VH2 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKAAGYFTFNWYIGWVIRQAPGQALEWNGDIYPGGGYTNY
VH1b QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFNWYIGWVIRQAPGQALEWNGDIYPGGGYTNY
VH1c QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFNWYIGWVIRQAPGQALEWNGDIYPGGGYTNY

マウス NEKFKGRVITADKSTSTAYMELSLRSEDVAVYCARGYDFVLDRWGGQTTVTVSS (配列番号 277)
A35790 NEKFKGRVITADKSTSTAYMELSLRSEDVAVYCARGYDFVLDRWGGQTTVTVSS (配列番号 139)
A35796 NEKFKGRVITADKSTSTAYMELSLRSEDVAVYCARGYDFVLDRWGGQTTVTVSS (配列番号 140)
A35793 NEKFKGRVITADKSTSTAYMELSLRSEDVAVYCARGYDFVLDRWGGQTTVTVSS (配列番号 141)
A35818 NEKFKGRVITADKSTSTAYMELSLRSEDVAVYCARGYDFVLDRWGGQTTVTVSS (配列番号 142)
A35795 NEKFKGRVITADKSTSTAYMELSLRSEDVAVYCARGYDFVLDRWGGQTTVTVSS (配列番号 143)
A35797 NEKFKGRVITADKSTSTAYMELSLRSEDVAVYCARGYDFVLDRWGGQTTVTVSS (配列番号 144)
A35799 NEKFKGRVITADKSTSTAYMELSLRSEDVAVYCARGYDFVLDRWGGQTTVTVSS (配列番号 145)
A35805 NEKFKGRVITADKSTSTAYMELSLRSEDVAVYCARGYDFVLDRWGGQTTVTVSS (配列番号 146)
VH1 NEKFKGRVITADKSTSTAYMELSLRSEDVAVYCARGYDFVLDRWGGQTTVTVSS (配列番号 147)
VH2 NEKFKGRVITADKSTSTAYMELSLRSEDVAVYCARGYDFVLDRWGGQTTVTVSS (配列番号 148)
VH1b NEKFKGRVITADKSTSTAYMELSLRSEDVAVYCARGYDFVLDRWGGQTTVTVSS (配列番号 149)
VH1c NEKFKGRVITADKSTSTAYMELSLRSEDVAVYCARGYDFVLDRWGGQTTVTVSS (配列番号 150)

【図 2 5 B】

137F2可変軽(VL)鎖

マウス DIVMSQSPSSLAVSTGEKVTITCKSSQSLFNSETQKNYLAWYQKPGQPPKLLIFWASTRES
A35790 DVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCKSSQSLFNSETQKNYLAWYQKPGQPPKLLIFWASTRES
A35796 DVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCKSSQSLFNSETQKNYLAWYQKPGQPPKLLIFWASTRES
A35793 DVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCKSSQSLFNSETQKNYLAWYQKPGQPPKLLIFWASTRES
A35818 DVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCKSSQSLFNSETQKNYLAWYQKPGQPPKLLIFWASTRES
A35795 DVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCKSSQSLFNSETQKNYLAWYQKPGQPPKLLIFWASTRES
A35799 DIQMTQSPSSLASVGDRTVITCKSSQSLFNSETQKNYLAWYQKPGQPPKLLIFWASTRES
A35805 DVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCKSSQSLFNSETQKNYLAWYQKPGQPPKLLIFWASTRES
A35805 DVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCKSSQSLFNSETQKNYLAWYQKPGQPPKLLIFWASTRES
VL1 DVVMTQSPDLSAVSLGERATITCKSSQSLFNSETQKNYLAWYQKPGQPPKLLIFWASTRES
VL2 DIVMTQSPDLSAVSLGERATITCKSSQSLFNSETQKNYLAWYQKPGQPPKLLIFWASTRES
VL1b DIVMTQSPDLSAVSLGERATITCKSSQSLFNSETQKNYLAWYQKPGQPPKLLIFWASTRES
VL1c DIVMTQSPDLSAVSLGERATITCKSSQSLFNSETQKNYLAWYQKPGQPPKLLIFWASTRES
VL1d DIVMTQSPDLSAVSLGERATITCKSSQSLFNSETQKNYLAWYQKPGQPPKLLIFWASTRES

マウス GVPDRFLSGSGGDTFTLTISSVQAEADVAVYCKQSYTLRTFGGQTKLEIK (配列番号 278)
A35790 GVPDRFSGSGGDTFTLTISSVQAEADVAVYCKQSYTLRTFGGQTKLEIK (配列番号 151)
A35796 GVPDRFSGSGGDTFTLTISSVQAEADVAVYCKQSYTLRTFGGQTKLEIK (配列番号 152)
A35793 GVPDRFSGSGGDTFTLTISSVQAEADVAVYCKQSYTLRTFGGQTKLEIK (配列番号 153)
A35818 GVPDRFSGSGGDTFTLTISSVQAEADVAVYCKQSYTLRTFGGQTKLEIK (配列番号 154)
A35795 GVPDRFSGSGGDTFTLTISSVQAEADVAVYCKQSYTLRTFGGQTKLEIK (配列番号 155)
A35797 GVPDRFSGSGGDTFTLTISSVQAEADVAVYCKQSYTLRTFGGQTKLEIK (配列番号 156)
A35799 GVPDRFSGSGGDTFTLTISSVQAEADVAVYCKQSYTLRTFGGQTKLEIK (配列番号 157)
A35805 GVPDRFSGSGGDTFTLTISSVQAEADVAVYCKQSYTLRTFGGQTKLEIK (配列番号 158)
VL1 GVPDRFSGSGGDTFTLTISSVQAEADVAVYCKQSYTLRTFGGQTKLEIK (配列番号 159)
VL2 GVPDRFSGSGGDTFTLTISSVQAEADVAVYCKQSYTLRTFGGQTKLEIK (配列番号 160)
VL1b GVPDRFSGSGGDTFTLTISSVQAEADVAVYCKQSYTLRTFGGQTKLEIK (配列番号 161)
VL1c GVPDRFSGSGGDTFTLTISSVQAEADVAVYCKQSYTLRTFGGQTKLEIK (配列番号 162)
VL1d GVPDRFSGSGGDTFTLTISSVQAEADVAVYCKQSYTLRTFGGQTKLEIK (配列番号 163)

【図 2 5 C】

135C12可変重(VH)鎖

マウス EVQLHOSGPELLKPGASVSRMSCKASGYFTFNFIHWRQAPGQALEWNGDIYPNYGDTAY
A35775 EVQLVQSGAEVKKPGESLKIISCKGSGYFTFNFIHWRQAPGQALEWNGDIYPNYGDTAY
A35783 EVQLVQSGAEVKKPGESLKIISCKGSGYFTFNFIHWRQAPGQALEWNGDIYPNYGDTAY
A35774 EVQLVQSGAEVKKPGESLKIISCKGSGYFTFNFIHWRQAPGQALEWNGDIYPNYGDTAY
A36443 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYFTFNFIHWRQAPGQALEWNGDIYPNYGDTAY
A35777 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYFTFNFIHWRQAPGQALEWNGDIYPNYGDTAY
A35789 EVQLVQSGAEVKKPGESLKIISCKGSGYFTFNFIHWRQAPGQALEWNGDIYPNYGDTAY
A36448 EVQLVQSGAEVKKPGESLKIISCKGSGYFTFNFIHWRQAPGQALEWNGDIYPNYGDTAY
A36437 EVQLVQSGAEVKKPGESLKIISCKGSGYFTFNFIHWRQAPGQALEWNGDIYPNYGDTAY
VH1 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFNFIHWRQAPGQALEWNGDIYPNYGDTAY
VH2 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFNFIHWRQAPGQALEWNGDIYPNYGDTAY
VH1b QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFNFIHWRQAPGQALEWNGDIYPNYGDTAY
VH1c QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFNFIHWRQAPGQALEWNGDIYPNYGDTAY
VH1d QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFNFIHWRQAPGQALEWNGDIYPNYGDTAY

マウス NQKFKDRVITADKSTSTAYMELSLRSEDVAVYCARGYDFVLDRWGGQTTVTVSS (配列番号 279)
A35775 NQKFKDRVITADKSTSTAYMELSLRSEDVAVYCARGYDFVLDRWGGQTTVTVSS (配列番号 164)
A35783 NQKFKDRVITADKSTSTAYMELSLRSEDVAVYCARGYDFVLDRWGGQTTVTVSS (配列番号 165)
A35774 NQKFKDRVITADKSTSTAYMELSLRSEDVAVYCARGYDFVLDRWGGQTTVTVSS (配列番号 166)
A36443 NQKFKDRVITADKSTSTAYMELSLRSEDVAVYCARGYDFVLDRWGGQTTVTVSS (配列番号 167)
A35777 NQKFKDRVITADKSTSTAYMELSLRSEDVAVYCARGYDFVLDRWGGQTTVTVSS (配列番号 168)
A35789 NQKFKDRVITADKSTSTAYMELSLRSEDVAVYCARGYDFVLDRWGGQTTVTVSS (配列番号 169)
A36448 NQKFKDRVITADKSTSTAYMELSLRSEDVAVYCARGYDFVLDRWGGQTTVTVSS (配列番号 170)
A36437 NQKFKDRVITADKSTSTAYMELSLRSEDVAVYCARGYDFVLDRWGGQTTVTVSS (配列番号 171)
VH1 NQKFKDRVITADKSTSTAYMELSLRSEDVAVYCARGYDFVLDRWGGQTTVTVSS (配列番号 172)
VH2 NQKFKDRVITADKSTSTAYMELSLRSEDVAVYCARGYDFVLDRWGGQTTVTVSS (配列番号 173)
VH3 NQKFKDRVITADKSTSTAYMELSLRSEDVAVYCARGYDFVLDRWGGQTTVTVSS (配列番号 174)
VH1b NQKFKDRVITADKSTSTAYMELSLRSEDVAVYCARGYDFVLDRWGGQTTVTVSS (配列番号 175)
VH1c NQKFKDRVITADKSTSTAYMELSLRSEDVAVYCARGYDFVLDRWGGQTTVTVSS (配列番号 176)
VH1d NQKFKDRVITADKSTSTAYMELSLRSEDVAVYCARGYDFVLDRWGGQTTVTVSS (配列番号 177)

【 図 2 5 D 】

135C12可変経(VL)鎖

マウス DIQMTQTSSLSASLGDRVTITCSASQGISGDLNMYQQKSGDITVKLLIYHTSSLHSGVPLR
A35775 DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCSASQGISGDLNMYQQKPGQAPRLLIYHTSSLHSGVPSR
A35783 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASQGISGDLNMYQQKPGKTPKLLIYHTSSLHSGVPSR
A35774 DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCSASQGISGDLNMYQQKPGKAPKLLIYHTSSLHSGVPSR
A36443 DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCSASQGISGDLNMYQQKPGQAPRLLIYHTSSLHSGVPSR
A35777 DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCSASQGISGDLNMYQQKPGQAPRLLIYHTSSLHSGVPSR
A35789 DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCSASQGISGDLNMYQQKPGQAPRLLIYHTSSLHSGI PAR
A36448 DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCSASQGISGDLNMYQQKPGKTPKLLIYHTSSLHSGVPSR
A36437 DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCSASQGISGDLNMYQQKPGQAPRLLIYHTSSLHSGI PAR
VL1 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASQGISGDLNMYQQKPGKAPKLLIYHTSSLHSGVPSR
VL2 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASQGISGDLNMYQQKPGKAVKLLIYHTSSLHSGVPLR
VL3 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASQGISGDLNMYQQKSGQAVKLLIYHTSSLHSGVPLR
VL1b DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASQGISGDLNMYQQKPGKAPKLLIYHTSSLHSGVPSR
VL1c DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASQGISGDLNMYQQKPGKAVKLLIYHTSSLHSGVPSR

マウス FSGSGSGDYSLTISLDLPEDFATYQCYYSKDLLTFGGGTKLEIK (配列番号 280)
A35775 FSGSGSGDFTLTISLQPEDFATYQCYYSKDLLTFGGGTKLEIK (配列番号 178)
A35783 FSGSGSGDFTLTISLQPEDFATYQCYYSKDLLTFGGGTKLEIK (配列番号 179)
A35774 FSGSGSGDFTLTISLQPEDFATYQCYYSKDLLTFGGGTKLEIK (配列番号 180)
A36443 FSGSGSGTEFTLTISRLEPEDFATYQCYYSKDLLTFGGGTKLEIK (配列番号 181)
A35777 FSGSGSGDFTLTISLQPEDFATYQCYYSKDLLTFGGGTKLEIK (配列番号 182)
A35789 FSGSGSGDFTLTISRLEPEDFATYQCYYSKDLLTFGGGTKLEIK (配列番号 183)
A36448 FSGSGSGDFTLTISLQPEDFATYQCYYSKDLLTFGGGTKLEIK (配列番号 184)
A36437 FSGSGSGDFTLTISLQPEDFATYQCYYSKDLLTFGGGTKLEIK (配列番号 185)
VL1 FSGSGSGDFTLTISLQPEDFATYQCYYSKDLLTFGGGTKLEIK (配列番号 186)
VL2 FSGSGSGDYTLTISLQPEDFATYQCYYSKDLLTFGGGTKLEIK (配列番号 187)
VL3 FSGSGSGDYTLTISLQPEDFATYQCYYSKDLLTFGGGTKLEIK (配列番号 188)
VL1b FSGSGSGDYTLTISLQPEDFATYQCYYSKDLLTFGGGTKLEIK (配列番号 189)
VL1c FSGSGSGDYTLTISLQPEDFATYQCYYSKDLLTFGGGTKLEIK (配列番号 190)

【 配列表 】

201951311800001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2017/000031

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 A61K39/395 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014/179664 A2 (ANAPTYSBIO INC [US]) 6 November 2014 (2014-11-06) paragraph [0090] - paragraph [0091] paragraph [0016] examples 1-3 claims 1-52	1,2, 17-25, 27-42, 46-49, 57-59
X	WO 2014/206107 A1 (SHANGHAI JUNSHI BIOSCIENCES INC [CN]; JUNMENG BIOSCIENCES CO LTD [CN]) 31 December 2014 (2014-12-31) the whole document	1,2, 17-25, 27-42, 46-49, 57-59
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
16 May 2017	14/07/2017	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Ulbrecht, Matthias	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2017/000031

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	-& EP 3 026 062 A1 (SHANGHAI JUNSHI BIOSCIENCES INC [CN]; JUNMENG BIOSCIENCES CO LTD [CN]) 1 June 2016 (2016-06-01) examples 4,12,13 figures 3,10,11 claims 1-15 -----	1,2, 17-25, 27-42, 46-49, 57-59
X	US 2013/108651 A1 (CARVEN GREGORY JOHN [US] ET AL) 2 May 2013 (2013-05-02) paragraph [0119] paragraph [0131] - paragraph [0134] paragraph [0143] paragraph [0159] - paragraph [0167] claims 1-19 -----	1,2, 17-25, 27-42, 46-49, 57-59
X	WO 2015/112800 A1 (REGENERON PHARMA [US]) 30 July 2015 (2015-07-30) paragraph [0191] - paragraph [0194] paragraph [0102] table 12 claims 1-56 -----	1,2, 17-25, 27-42, 46-49, 57-59
X	FAGHFURI ELNAZ ET AL: "Nivolumab and pembrolizumab as immune-modulating monoclonal antibodies targeting the PD-1 receptor to treat melanoma", EXPERT REVIEW OF ANTICANCER THERAPY, FUTURE DRUGS LTD, UK, vol. 15, no. 9, 1 January 2015 (2015-01-01), pages 981-993, XP009194371, ISSN: 1744-8328 the whole document -----	1,2, 17-42, 46-49, 57-59
X	S. T. HAILE ET AL: "Soluble CD80 Restores T Cell Activation and Overcomes Tumor Cell Programmed Death Ligand 1-Mediated Immune Suppression", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 191, no. 5, 5 August 2013 (2013-08-05), pages 2829-2836, XP055371468, US ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.1202777 page 2, left-hand column, paragraph 1 -----	1,2, 17-42, 46-49, 57-59

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2017/000031

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1, 2(completely); 17-42, 46-49, 57-59(partially)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/IB2017/000031

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 2(completely); 17-42, 46-49, 57-59(partially)

A binding agent that binds PD1 as defined in claim 1; a derivative thereof; an isolated polynucleotide encoding said binding agent or derivative; an expression vector comprising one or more of said polynucleotides; a host cell comprising said isolated polynucleotide and/or expression vector; a composition as defined in claim 32, but limited to the aforesaid products; a method as defined in claims 33 and 38, but limited to the aforesaid binding agent or derivative; a kit as defined in claim 48, but limited the aforesaid binding agent or derivative; a method of producing the aforesaid binding agent;

2. claims: 3, 43-45, 85-101(completely); 17-42, 46-49, 57-59(partially)

A binding agent as defined in claim 3; a derivative thereof; an isolated polynucleotide encoding said binding agent or derivative; an expression vector comprising one or more of said polynucleotides; a host cell comprising said isolated polynucleotide and/or expression vector; a composition as defined in claim 32, but limited to the aforesaid products; a method as defined in claims 33 and 38, but limited to the aforesaid binding agent or derivative; a kit as defined in claim 48, but limited the aforesaid binding agent or derivative; a method of producing the aforesaid binding agent; a method as defined in claims 43, 85, 86 and 88.

3. claims: 4, 5(completely); 17-42, 46-49, 57-59(partially)

A binding agent as defined in claim 4; a derivative thereof; an isolated polynucleotide encoding said binding agent or derivative; an expression vector comprising one or more of said polynucleotides; a host cell comprising said isolated polynucleotide and/or expression vector; a composition as defined in claim 32, but limited to the aforesaid products; a method as defined in claims 33 and 38, but limited to the aforesaid binding agent or derivative; a kit as defined in claim 48, but limited the aforesaid binding agent or derivative; a method of producing the aforesaid binding agent.

4. claims: 6(completely); 17-42, 46-49, 57-59(partially)

A binding agent as defined in claim 6; a derivative thereof; an isolated polynucleotide encoding said binding agent or derivative; an expression vector comprising one or more of said polynucleotides; a host cell comprising said isolated

International Application No. PCT/IB2017/000031

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

polynucleotide and/or expression vector; a composition as defined in claim 32, but limited to the aforesaid products; a method as defined in claims 33 and 38, but limited to the aforesaid binding agent or derivative; a kit as defined in claim 48, but limited the aforesaid binding agent or derivative; a method of producing the aforesaid binding agent.

5. claims: 7-16, 50-56, 60-78(completely); 17-42, 46-49, 57-59(partially)

A binding agent as defined in claims 7 and 12-14; a derivative thereof; ; an isolated polynucleotide encoding said binding agent or derivative; an expression vector comprising one or more of said polynucleotides; a host cell comprising said isolated polynucleotide and/or expression vector; a composition as defined in claim 32, but limited to the aforesaid products or a combination according to claim 50; a method as defined in claims 33 and 38, but limited to the aforesaid binding agent or derivative; a kit as defined in claim 48, but limited the aforesaid binding agent or derivative; a combination according to claim 50; a method for producing the combination of claim 50 as defined in claim 55; a method for producing the aforesaid binding agent; a method for affecting the function of PD-1 as defined in claims 60 and 62.

6. claims: 79-84(partially)

A modified PD1 polypeptide according to SEQ ID No. 244; a method of determining the epitope(s) on PD1 to which a binding agent binds using said modified PD1 polypeptide; a kit as defined in claim 84, but limited to SEQ ID No. 244.

- 7-36. claims: 79-84(partially)

idem as invention 7, but each of inventions 8-37 limited to one of SEQ ID Nos. 245-274.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2017/000031

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014179664 A2	06-11-2014	AU 2014259719 A1	17-12-2015
		CA 2910278 A1	06-11-2014
		CN 105339389 A	17-02-2016
		EP 2992017 A2	09-03-2016
		HK 1219743 A1	13-04-2017
		JP 2016523516 A	12-08-2016
		KR 20160034247 A	29-03-2016
		RU 2015151505 A	07-06-2017
		SG 11201508528T A	27-11-2015
		US 2016075783 A1	17-03-2016
		WO 2014179664 A2	06-11-2014
WO 2014206107 A1	31-12-2014	CN 104250302 A	31-12-2014
		EP 3026062 A1	01-06-2016
		JP 2016523265 A	08-08-2016
		PH 12015502819 A1	21-03-2016
		US 2016272708 A1	22-09-2016
		WO 2014206107 A1	31-12-2014
EP 3026062 A1	01-06-2016	CN 104250302 A	31-12-2014
		EP 3026062 A1	01-06-2016
		JP 2016523265 A	08-08-2016
		PH 12015502819 A1	21-03-2016
		US 2016272708 A1	22-09-2016
		WO 2014206107 A1	31-12-2014
US 2013108651 A1	02-05-2013	AU 2008266951 A1	24-12-2008
		BR P10812913 A2	09-12-2014
		CA 2691357 A1	24-12-2008
		CA 2855098 A1	24-12-2008
		CN 102131828 A	20-07-2011
		CN 104945508 A	30-09-2015
		CY 1114849 T1	22-06-2016
		DK 2170959 T3	13-01-2014
		EP 2170959 A1	07-04-2010
		EP 2535354 A1	19-12-2012
		ES 2437327 T3	10-01-2014
		ES 2616355 T3	12-06-2017
		HK 1140497 A1	07-03-2014
		HR P20131167 T1	03-01-2014
		HU S1500071 I1	29-02-2016
		IL 202813 A	31-03-2015
		JP 5191537 B2	08-05-2013
		JP 5640052 B2	10-12-2014
		JP 2010530753 A	16-09-2010
		JP 2012254092 A	27-12-2012
		KR 20100054780 A	25-05-2010
		KR 20140133954 A	20-11-2014
		KR 20150055114 A	20-05-2015
		LU 92936 I2	29-02-2016
		NO 2015028 I1	11-01-2016
		NZ 582150 A	31-08-2012
		NZ 600758 A	27-09-2013
PH 12015501524 A1	22-02-2016		
PT 2170959 E	07-01-2014		
RS 53072 B	30-04-2014		
SI 2170959 T1	30-04-2014		
US 2010266617 A1	21-10-2010		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2017/000031

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2013108651 A1	02-05-2013
		US 2013109843 A1	02-05-2013
		US 2015232555 A1	20-08-2015
		WO 2008156712 A1	24-12-2008

WO 2015112800	A1	30-07-2015	AU 2015209233 A1
			04-08-2016
			CA 2936075 A1
			30-07-2015
			CN 106068275 A
			02-11-2016
			EA 201691482 A1
			30-11-2016
			EP 3097119 A1
			30-11-2016
			JP 2017505125 A
			16-02-2017
			KR 20160132010 A
			16-11-2016
			PH 12016501330 A1
			15-08-2016
			SG 11201605482S A
			30-08-2016
			TW 201540726 A
			01-11-2015
			US 2015203579 A1
			23-07-2015
			UY 35964 A
			31-08-2015
			WO 2015112800 A1
			30-07-2015

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H 0 4 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 0 7 K 14/725 (2006.01)	C 0 7 K 14/725	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	Y
A 6 1 K 51/04 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	A 6 1 K 51/04	2 0 0
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/574	A
	C 0 7 K 16/28	
	C 0 7 K 16/46	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, T J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, G T, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(72)発明者 フェンウィック, クレイグ

スイス国 C H - 1 0 0 5 ローザンヌ アヴェニュー ドゥ レマン 3 6

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 DA01 DA05 DA14 DA15

4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA93Y AB01 BA02 CA24 CA25 CA44
CA46

4C084 AA02 AA13 BA01 BA08 BA21 BA23 CA53 MA02 MA44 NA14
ZA01 ZB08 ZB26 ZB32 ZC41 ZC55

4C085 AA13 AA14 AA15 AA16 AA25 AA27 BB31 BB33 BB34 BB35
BB36 BB37 BB41 BB42 BB43 BB50 CC22 CC23 DD62 EE01
EE03 HH13 KA03 KA04 KA05 KB37

4C087 AA01 AA02 BB65 MA02 MA44 NA14 ZA01 ZB08 ZB26 ZB32
ZC41 ZC55

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA76 EA22
EA28 EA29 EA51 EA52 FA74

专利名称(译)	免疫试剂		
公开(公告)号	JP2019513118A	公开(公告)日	2019-05-23
申请号	JP2018538647	申请日	2017-01-20
[标]申请(专利权)人(译)	MABQUEST		
[标]发明人	パンタレオジュゼッペ フェンウィッククレイグ		
发明人	パンタレオ,ジュゼッペ フェンウィック,クレイグ		
IPC分类号	A61K38/16 C12N15/13 C12N15/63 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 C07K14/725 A61P25/00 A61P43/00 A61P37/06 A61P31/18 A61P31/00 A61P35/00 A61K39/395 A61K35/76 A61K48 /00 A61K51/04 G01N33/53 G01N33/574 C07K16/28 C07K16/46		
CPC分类号	C07K16/2803 A61K39/39541 A61K39/39558 A61K2039/507 A61P31/18 A61P35/00 C07K16/2818 C07K2317/24 C07K2317/33 C07K2317/34 C07K2317/75 C07K2317/76		
FI分类号	A61K38/16.ZNA C12N15/13 C12N15/63.Z C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 C07K14/725 A61P25/00 A61P43/00.111 A61P37/06 A61P31/18 A61P31/00 A61P35/00 A61P43/00. 105 A61K39/395.N A61K39/395.Y A61K39/395.D A61K35/76 A61K48/00 A61K51/04.200 G01N33/53. D G01N33/574.A C07K16/28 C07K16/46		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA05 4B064/DA14 4B064/DA15 4B065 /AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065 /CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA21 4C084/BA23 4C084/CA53 4C084/MA02 4C084/MA44 4C084/NA14 4C084/ZA01 4C084 /ZB08 4C084/ZB26 4C084/ZB32 4C084/ZC41 4C084/ZC55 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA15 4C085/AA16 4C085/AA25 4C085/AA27 4C085/BB31 4C085/BB33 4C085/BB34 4C085/BB35 4C085 /BB36 4C085/BB37 4C085/BB41 4C085/BB42 4C085/BB43 4C085/BB50 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/HH13 4C085/KA03 4C085/KA04 4C085/KA05 4C085 /KB37 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB65 4C087/MA02 4C087/MA44 4C087/NA14 4C087/ZA01 4C087/ZB08 4C087/ZB26 4C087/ZB32 4C087/ZC41 4C087/ZC55 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045 /AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/EA28 4H045/EA29 4H045/EA51 4H045/EA52 4H045/FA74		
代理人(译)	伴野博之 高桥秀明		
优先权	62/286269 2016-01-22 US 62/290745 2016-02-03 US		
其他公开文献	JP2019513118A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本公开内容提供了对程序性细胞死亡1 (PD-1) 具有特异性的结合剂, 以及治疗, 预防和/或治疗感染 (例如, 人免疫缺陷病毒 (HIV)), 癌症和/或自身免疫。或者使用它来改进的方法。另外, 本公开对PD-1是新的, 其涉及PD-1的先前未鉴定的功能活性, 其区别于与PD-L1或PD-L2配体相关的相互作用位点。识别绑定补丁 (“P2”)。此外, 与PD-1的这个区域相互作用的抗体可以作为PD-1的拮抗剂, 并且其拮抗作用通过阻断PD-1 / PD-L1 / L2相互作用的抗体。证明它与进一步增强相结合进一步增强

Figure 2

